

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»
«Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

Ρούτερ Ειρήνη, Γεωργία, Άννα

**Δημιουργία «PCR arrays» για την ανίχνευση
και τον μοριακό χαρακτηρισμό των
Νοροϊών σε μη επεξεργασμένα λύματα**

Επιβλέπων καθηγητής:

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Λάρισα 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ.9.....
Ημερομηνία11-2-10.....

**Δημιουργία «PCR arrays» για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των
Νοροϊών σε μη επεξεργασμένα λύματα**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8108/1

Ημερ. Εισ.: 08-03-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

579.25

ΡΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087136

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Κοιμώτης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση
Βιοδραστικών Μορίων

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μόσιαλος Δημήτριος

Λέκτορας - Βιοτεχνολογία Μικροβίων

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος και η συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα αποτελούσε πολύ δύσκολο έργο χωρίς την απαραίτητη συνδρομή και συμπαράσταση ορισμένων ατόμων.

Για τον λόγο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κύριο Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την επιστημονική γνώση και προσωπικό ενδιαφέρον που τόσο απλόχερα μου παρείχε καθώς επίσης και για τα ερεθίσματα που μου έδωσε και με οδήγησε να αγαπήσω τον «κόσμο» της ιολογίας.

Ακόμα την Βάϊα Πλιάκα και τον Δημήτρη Τσακογιάννη οι οποίοι πρόσφεραν με ευγένεια τη γνώση σχετικά με την ιολογία. Επίσης για την απαραίτητη και τόσο σημαντική προσφορά τους καθ' όλη τη διεξαγωγή του πειράματος αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αρραβωνιαστικό μου Γιώργο Γκόρα και την μητέρα μου Αντωνία Ρούτερ των οποίων η συμβολή κατά την διάρκεια των σπουδών μου ήταν συνεχείς και υπερπολύτιμη σε όλους τους τομείς και που χωρίς τη δική τους συμπαράσταση και αγάπη δε θα κατάφερνα να συνεχίζω να σπουδάζω το αντικείμενο που αγάπησα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ιστορική αναδρομή	9
1.2. Ταξινόμηση	11
1.3 Βιολογία των Νοοϊών	14
1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	14
1.3.2 Γονιδιακή οργάνωση	15
1.3.3 Δομή ιοσωματίου	16
1.3.4 Μετάφραση, επεξεργασία και λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών	19
1.3.5 Αντιγραφή του ιικού RNA	20
1.4 Παθογένεια	21
1.4.1 Πρόσδεση στον υποδοχέα	21
1.4.2 Ο πολυμορφικός υποδοχέας των νοοϊών	22
1.5 Ετερογένεια και εξέλιξη	24
1.5.1 Η εξέλιξη του καψιδίου	24
1.5.2 Αντιγονικές παραλλαγές και ανοσοποίηση	28
1.6 Επιδημιολογία	31
1.6.1 Πρόληψη και έλεγχος	33
1.6.2 Εμβόλια	34
1.7 Διαγνωστικές μέθοδοι	34

1.7.1 Ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέος	35
1.7.2 Διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς	36
1.7.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία	36
1.7.4 Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία	37
1.7.5 Άνοση αιμοσυγκόλληση	37
1.7.6 Ανοσολογικές αντιδράσεις	37
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1 Πειραματικά στελέχη	39
2.1.1 Θετικοί μάρτυρες	39
2.1.2 Περιβαλλοντικά δείγματα	39
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων	41
2.2.1 Μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων	41
2.2.2 Μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα	41
2.3 Εκχύλιση του ιικού RNA	42
2.4 Αντίστροφη Μεταγραφάση (Reverse Transcription – RT)	43
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	44
2.5.1 Εκκινητικά μόρια	44
2.5.2 Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης	51
2.6 Κλωνοποίηση	56
2.6.1 Καθαρισμός των προϊόντων	56
2.6.2 Autonested GoTaq PCR	56
2.6.3 Μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων	56

2.6.4 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων	62
2.6.5 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	62
2.6.6 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	63
2.6.7 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας	63
2.6.8 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών	64
2.6.9 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων	65
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
3.1 Αποτελέσματα PCR, Autonested και Seminested	66
3.2 Αποτελέσματα Autonested GoTaq PCR	69
3.3 Αποτελέσματα της μοριακής κλωνοποίησης	69
3.4 Ταυτοποίηση μέσω αλληλούχισης στελεχών των θετικών δειγμάτων	71
3.5 Φυλογενετική ανάλυση στελεχών	71
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, γνωστά για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών και θεωρούνται υπεύθυνοι για πάνω από το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας

Η επιτυχής κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού, από δείγματα κοπράνων, επέτρεψε να χαρακτηριστεί ο ιός ως calicivirus, δηλαδή ότι κατέχει ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA (ssRNA) γένωμα, 7,7 κιλοβάσεων περίπου, το οποίο προστατεύεται από το περιβάλλον από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δεν περιβάλλεται από φάκελο. Στο 5' άκρο του γενώματος βρίσκεται συνδεδεμένη μια πρωτεΐνη (VPg) ενώ το 3' άκρο του περιλαμβάνει ουρά πολυαδενίνης (polyA). Επίσης, το ιικό γονιδίωμα οργανώνεται σε τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Το ORF1 κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία παράγει τις ώριμες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Τα υπόλοιπα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF2 και ORF3) κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες, εκ των οποίων η VP1 είναι υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του ιού.

Οι νοροϊοί, ταξινομούνται ως βιολογικοί παράγοντες κατηγορίας B, λόγω της υψηλής μολυσματικής τους ικανότητας, μικρότερη από 10 ιοσωμάτια ανά άτομο και λόγω της σταθερότητάς που παρουσιάζουν στο περιβάλλον. Η ασθένεια που προκύπτει μετά από μόλυνση με τον ιό, συνήθως, δεν διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα σε υγιείς ενήλικες (12 – 24 ώρες), αλλά μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού. Επίσης, οι νοροϊοί δεν προκαλούν πάντα μόνιμη ανοσοποίηση και σε συνδυασμό με την σημαντική ετερογένεια και ευμεταβλητότητά τους, αποτελούν σημαντικό επιδημιολογικό κίνδυνο σε παγκόσμιο επίπεδο.

Στην παρούσα διατριβή, η αρχική ανίχνευση νοροϊών, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της RT-PCR τεχνικής με ήδη υπάρχοντα από την βιβλιογραφία εκκινητικά μόρια και εφαρμόστηκαν οι autonested, nested ή seminested PCR. Η ανίχνευση ενός θετικού για νοροϊούς κλινικού δείγματος, επέτρεψε την αλληλούχιση περιοχών του γονιδιώματος και την μετέπειτα χρήση των αποτελεσμάτων αυτών, για τον σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων, προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τελικά, επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας περιοχής η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του ORF1, ολόκληρο το ORF2 και το 5' άκρο του ORF3.

Επιπλέον, από τα 11 περιβαλλοντικά δείγματα που αναλύθηκαν, προέκυψαν τρία θετικά για την παρουσία νοροϊών με προέλευση τους βιολογικούς καθαρισμούς των Τρικάλων, της Λάρισας και των Ιωαννίνων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, γνωστά για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών. Τα κέντρα ελέγχου και πρόληψης, που είναι υπεύθυνα για περιπτώσεις που εμφανίζουν την αναμενόμενη κλινική εικόνα, υποβάλλουν εκθέσεις ετησίως, όπου οι ιοί αυτοί, είναι υπεύθυνοι για πάνω από το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας, με τουλάχιστον 23 εκατομμύρια μολύνσεις ετησίως μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (1) και παγκοσμίως, μέχρι τα μισά από όλα τα κρούσματα γαστρεντερίτιδας (2), καθιστώντας έτσι, τον ιό αυτό, την περισσότερη κοινή αιτία εμφάνισης σποραδικής διάρροιας σε επίπεδο πληθυσμού (3).

Η μόλυνση από νοροϊό ήταν γνωστή, στην ιατρική βιβλιογραφία, σαν την ασθένεια του χειμερινού εμετού, τη γρίπη στομάχων και τη γαστρική γρίπη, με την αναφορά στη γρίπη να απεικονίζει την έλλειψη γνώσης για τον συγκεκριμένο ιό επισημαίνοντας ταυτόχρονα το γεγονός, ότι οι νοροϊοί και οι ιοί της γρίπης μοιράζονται παρόμοια εποχικότητα (4).

Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου, καλλιεργήθηκε η υπόθεση ύπαρξης μη βακτηριακής και μη παρασιτικής αιτίας εμφάνισης γαστρεντερίτιδας η οποία δεν σχετίζεται με τον ιό της γρίπης. Σε πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, διαπιστώθηκε ότι το 75% περίπου των περιπτώσεων εμφάνισης γαστρεντερίτιδας σε περίοδο 30 ετών, δεν είχε επαρκή αιτιολόγηση και παρουσίαζε οξεία και μεταδοτική μορφή, μη βακτηριακής προέλευσης (5). Παράλληλες κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εθελοντές, στις Ηνωμένες Πολιτείες (6) και στην Ιαπωνία (7), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ιικής φύσεως διηθητοί μολυσματικοί παράγοντες έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν εντερική ασθένεια. Συγκεκριμένα, στις αναφερθείσες μελέτες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κοπράνων τα οποία είχαν προηγουμένως φιλτραριστεί για την απομάκρυνση των βακτηρίων και κατόπιν χορηγήθηκαν σε ενήλικους εθελοντές, οι οποίοι τελικά παρουσίασαν την εντερική νόσο.

Οι νοροϊοί, οφείλουν το όνομά τους στον ιό του γένους που ανακαλύφθηκε πρώτος, τον Norwalk. Η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση σημειώθηκε το 1968

κατά τη διάρκεια επιδημίας σε δημοτικό σχολείο στο Νόργουοκ του Οχάιο (8), όπου το 50% των δασκάλων και των μαθητών νόσησε, ενώ ακολούθησε το 32% περίπου των συγγενών τους. Η ασθένεια χαρακτηριζόταν από ναυτία και έμετο σε πάνω από το 90% των ασθενών και από διάρροια στο 38%, ενώ η διάρκειά αυτής ήταν συνήθως από 12 έως 24 ώρες (9). Για την εξακρίβωση του αιτιολογικού παράγοντα του κρούσματος ακολούθησε η χορήγηση εκχυλισμάτων κοπράνων, ελεύθερων βακτηρίων, από τους προσβεβλημένους ασθενείς σε εθελοντές. Η φυσικοχημική επεξεργασία των παρασκευασμάτων αποκάλυψε ότι, πρόκειται για έναν μικρό σε μέγεθος (<36nm) αιτιολογικό παράγοντα ιικής φύσης. Κατόπιν, ακολούθησαν προσπάθειες αναπαραγωγής του παράγοντα αυτού σε κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματόζωα χωρίς επιτυχία (10).

Ο ιός παρατηρήθηκε για πρώτη φορά μέσω ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας (IEM) το 1972. Τα σωματίδια του ήταν μικρά, μεγέθους από 27nm έως 32nm, σφαιρικά, με ένδειξη επιφανειακής δομής. Η μικροσκοπήση πραγματοποιήθηκε σε διηθήματα κοπράνων από τους εθελοντές των κρουσμάτων του Norwalk και από τους εθελοντές που ακολούθως μολύνθηκαν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εύρεση του ιού βασίστηκε στην κατακρήμνιση ικών σωματιδίων, τα οποία προέκυψαν από ορό ασθενών, που ευρίσκονταν σε φάση ανάρρωσης, μετά την αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος (11).

Με την πάροδο του χρόνου ανακαλύφθηκαν και άλλοι ιοί, οι οποίοι έχουν την ικανότητα πρόκλησης κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας και εμφανίζουν παραπλήσια μορφολογική δομή με τον ιό του Norwalk, όπως ο Hawaii και ο Snow Mountain (12,13) οι οποίοι έχουν διαχωριστεί από τους νοροϊούς και φέρουν το όνομα SLVs (Sapporo-like viruses) (14).

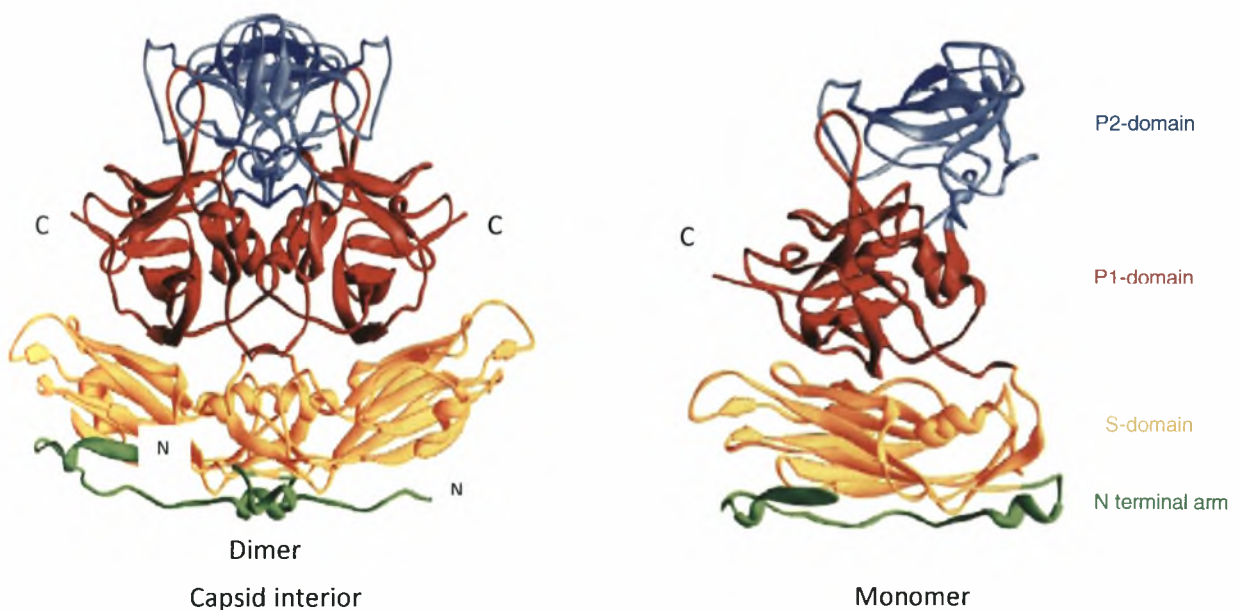
Από τα τέλη της δεκαετίας του '80, ξεκίνησε η προσπάθεια για την μοριακή ανάλυση των νοροϊών. Έτσι επιτεύχθηκε η πραγματοποίηση του αρχικού χαρακτηρισμού του RNA γενώματος του ιού και εν συνεχεία, ο χαρακτηρισμός του ως μέλος των Caliciviridae. Τα επόμενα χρόνια, ακολούθησε η περαιτέρω ανάλυση του γενώματος του Norwalk ιού (15), καθώς και η ανάλυση των γενωμάτων και άλλων νοροϊών που εμπλέκονται στην μολυσματική γαστρεντερίτιδα. Το 1993 ανακοινώθηκε η πλήρης αλληλουχία του Southampton ιού, ο οποίος απομονώθηκε από ένα παιδί 2 ετών, σε ένα οικογενειακό κρούσμα γαστρεντερίτιδας στο Southampton του Ηνωμένου Βασιλείου το 1991 (16). Ακολούθησε η κλωνοποίηση του γενώματος ιών που ευθύνονται για προσβολή σε ζωικούς οργανισμούς εμπορικής

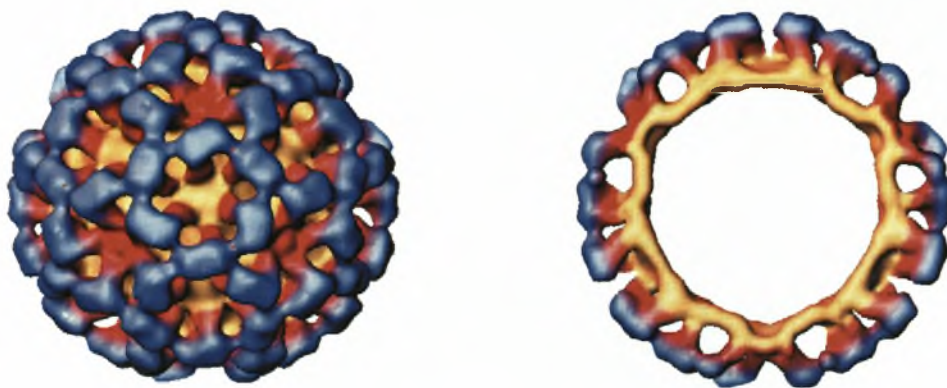
εκμετάλλευσης, όπως ο SW43 των χοίρων και ο Jena των βοοειδών και οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως νοροϊοί (17, 18).

Σήμερα, για την ανίχνευση των νοροϊών χρησιμοποιούνται οι αντιδράσεις RT-PCR (19). Εντούτοις η ανίχνευση είναι δύσκολη, κυρίως λόγω της ιδιαίτερα μεταβλητής φύσης του ιού αλλά και λόγω των επιπτώσεων που υφίσταται η συγκέντρωση του κατά την εξαγωγή του από το προς εξέταση δείγμα.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η εποχή των μοριακών μελετών των νοροϊών άρχισε με την επιτυχή κλωνοποίηση του γονιδιώματος του ιού, από δείγματα κοπράνων (20). Το γεγονός αυτό, επέτρεψε να χαρακτηριστεί ο ιός ως calicivirus, δηλαδή ότι κατέχει ένα γραμμικό, θετικής πολικότητας, μονόκλωνο RNA (ssRNA) γένωμα, 7,7 κιλοβάσεων περίπου, το οποίο προστατεύεται από το περιβάλλον από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, αλλά δεν περιβάλλεται από φάκελο. Το καψίδιο αυτό, αποτελείται από μια σημαντική πρωτεΐνη, γνωστή ως πρωτεΐνη 1 (VP1) και μερικά αντίγραφα μιας δεύτερης μικρής βασικής δομικής πρωτεΐνης που είναι γνωστή ως VP2, (εικ. 1) (20 – 22).

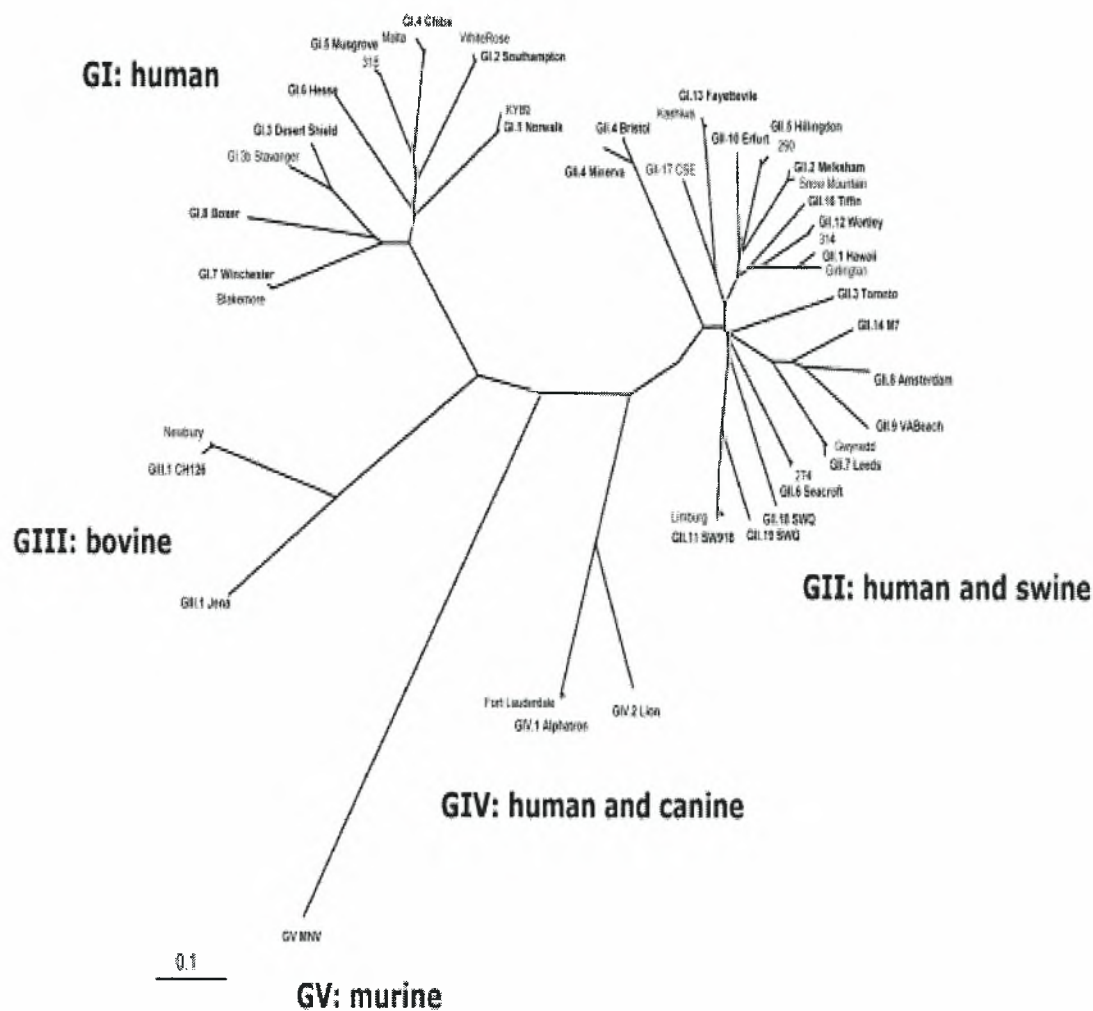




Εικ.1. Η δομή των μορίων του Νόργουωκ (NV VLP). Μικροσκοπική αναδημιουργία με χρήση κρυό – ηλεκτρονικής μικροσκοπίας 22Å° και ακτίνων X, κρυσταλλογραφία σε 34Å°. Το NV VLPs συγκεντρώνει 90 διμερή του πρωτεϊνικού καψιδίου (αριστερά, διάγραμμα κορδελλών) σε T Ό 3 εικοσαεδρική συμμετρία. Κάθε μονομερής καψιδική πρωτεΐνη (δεξιά, διάγραμμα κορδελλών) διαιρείται σε μία άμινο-τελική περιοχή βραχιόνων (πράσινο), που βρίσκεται αντιμέτωπη με το εσωτερικό του VLP, περιοχή κοχυλίων (s-περιοχή, κίτρινο) διαμορφώνοντας την συνεχή επιφάνεια του και μια προεξέχουσα περιοχή (P-περιοχή) η οποία προέρχεται από την επιφάνεια των S-περιοχών. Η P-περιοχή διαιρείται περαιτέρω σε υποπεριοχές, τις P1 και P2 (κόκκινο και μπλε, αντίστοιχα) με την P2-υποπεριοχή να βρίσκεται στην πιο ακραία επιφάνεια του VLPs (21, 23).

Μέχρι σήμερα, η τεχνολογία της RT-PCR έχει επιτρέψει τον μοριακό χαρακτηρισμό πολλών στελεχών νοροϊών από δείγματα γαστρεντερικής και εντερικής εκκένωσης και την κλωνοποίησή τους, με αποτέλεσμα οι συγκρίσεις της ακολουθίας που προέκυψαν, μετά την εφαρμογή αυτών των τεχνικών, να δείξουν ότι οι νοροϊοί μπορούν να ταξινομηθούν σε τουλάχιστον πέντε γενετικές ομάδες, κυρίως με βάση την ομοιότητα στις ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος, όπως της RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης RNA (RdRp) και της περιοχής της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης (24,25). Δύο από αυτές τις γενετικές ομάδες, αποκαλούμενες genogroups I και II (GI και GII), περιέχουν την πλειοψηφία των νοροϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Επίσης, από τη φυλογενετική ανάλυση τους, προκύπτει ότι και άλλοι caliciviruses οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση μόλυνσης σε βοοειδή, χοίρους και ποντίκια, εμπίπτουν επίσης στο γένος των νοροϊών (26-30). Οι παθογόνοι caliciviruses που προσβάλλουν κυρίως τα βοοειδή, συγκεντρώνονται σε μία προτεινόμενη GIII ομάδα, αν και τα μέλη του εμφανίζουν πιο πολλές ομοιότητες με την ομάδα GI (26-28). Τέλος, η φυλογενετική ανάλυση τοποθετεί τουλάχιστον δύο στελέχη νοροϊών που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, σε μια προτεινόμενη GIV

ομάδα: στελέχη Alpatron (Genbank accession number AF195847) και Ft. Lauderdale (Genbank accession number AF414426) (31).



Εικ 2. M.M. Patel et al. / Journal of Clinical Virology 44 (2009)

Οι νοριοιό των γενετικών ομάδων GI και GII μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε γενότυπους (clusters), (πίνακας 1).

Πίνακας 1

Virus Name	Accession Number	G	gc	Outbreak Site	Year	Le ^c	H1	Le ^a	Carbohydrate-binding ^b							A
									Le ^c	H2	Le ^x	Le ^y	H3			
Norwalk	M87661	I	1	Norwalk, OH, USA	1968	o	+	o	+	+	o	+	+	+		
Hawaii	U07611	II	1	Hawaii, USA	1971	nd	o	o	o	nd	nd	nd	o	o		
Snow Mountain	AY134748	II	2	Snow Mountain, CO, USA	1976	nd	o	o	o	nd	nd	nd	o	o		
Mexico	U22498	II	3	Mexico City, Mexico	1988	nd	+	s	nd	+	s	nd	nd	+		
Grimsby	AJ004864	II	4	Grimsby, UK	1995	o	+	o	+	+	o	+	nd	+		
VA387	AY038600	II	4	Virginia, USA	1998	nd	+	s	o	+	s	nd	o	+		
MOH	AF397156	II	5	Three cities in Hungary	1999	nd	+	s	o	+	s	nd	o	+		
VA207	AY038699	II	na	Virginia, USA	1997	nd	o	+	s	o	nd	+	s	nd		

^aAbbreviations: G, genogroup; gc, genetic cluster; Le, Lewis; na, not assigned [4] or nominally assigned gc 8 [19]; nd, not done; o, no binding; +, binding; +s, binding by saliva and red blood cell binding assays; +s, binding inferred by saliva binding assays.

^bCarbohydrates listed below.

Le^c: H type 1 precursor, Galβ1,3GlcNAcβ-

H1: H type 1, Le^a, Fucα1,2Galβ1,3GlcNAcβ-

Le^a: Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAcβ-

Le^b: Fucα1,2Galβ1,3(Fucα1,4)GlcNAcβ-

H2: H type 2, Fucα1,2Galβ1,4GlcNAcβ-

Le^x: Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-

Le^y: Fucα1,2Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-

H3: H type 3, Fucα1,2Galβ1,3GalNAcα-

A: GalNAcα1,3(Fucα1,2)Galβ-

B: Galα1,3(Fucα1,2)Galβ-

Έτσι, για την ταξινόμηση των νοροϊών, χρησιμοποιούνται συστήματα γενοτυπικής ανάλυσης των στελεχών, που εντοπίζονται σε κάθε περίοδο του έτους, τα οποία βασίζονται στη γενετική συγγένεια που εμφανίζει η κύρια καψιδική πρωτεΐνη (στην πλήρη ή μερική αλληλουχία) και η οποία αντιστοιχεί στην αντιγονική μοναδικότητα που εμφανίζει το κάθε στέλεχος. Σύμφωνα με ένα από τα πιο πρόσφατα γενοτυπικά συστήματα, οι νοροϊοί διαιρούνται σε πέντε γενετικές ομάδες που ονομάζονται GI έως GV. Οι ομάδες GI, GII και GIII υποδιαιρούνται περαιτέρω σε 8, 19 και 2 γενότυπους αντίστοιχα, ενώ οι ομάδες GIV και GV περιλαμβάνουν από έναν μόνο γενότυπο (32).

Αν και τα στελέχη του ιού μπορούν να εμφανιστούν ταυτόχρονα, όπως και διαφορετικά στελέχη μπορούν να εμφανιστούν σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και σε διαφορετικούς χρόνους, η ομάδα GII.4 των νοροϊών είναι η κυρίαρχη, με στελέχη που ανιχνεύονται στον πληθυσμό από τη δεκαετία του '80 (31 – 33).

1.3 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ

1.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

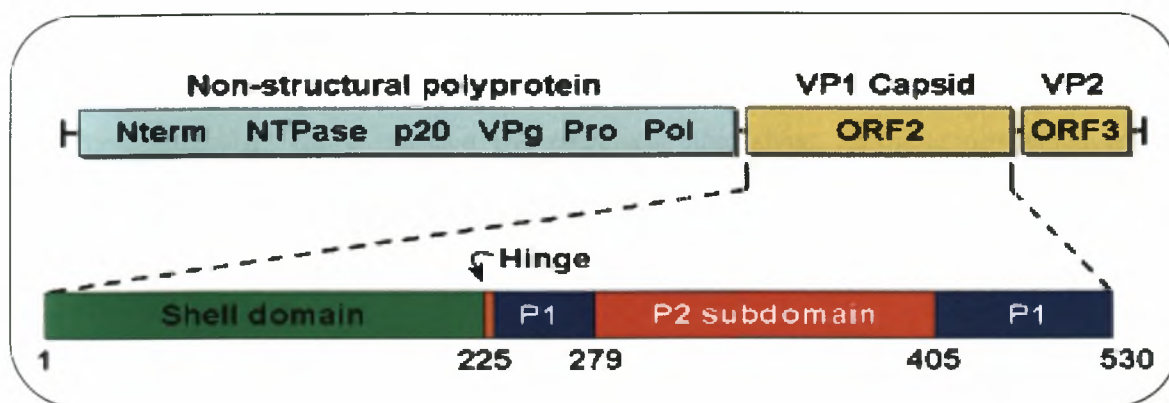
Οι νοροϊοί ταξινομούνται ως βιολογικοί παράγοντες κατηγορίας Β λόγω της υψηλής μολυσματικής τους ικανότητας, μικρότερη από 10 ιοσωμάτια ανά άτομο

(ID50) και της σταθερότητάς που παρουσιάζουν στο περιβάλλον, όπως την αντίσταση σε χαμηλές θερμοκρασίες (60°C), στην απολύμανση με χλώριο, στο ξίδι, στο οινόπνευμα και στα μέτρα αποστείρωσης (απολύμανση χεριών) (34).

Παρά το σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο και την ιδιαίτερη νοσηρότητα που προκαλείται από την προσβολή του ανθρώπου, μέχρι σήμερα κανένα φάρμακο ή εμβόλιο δεν είναι διαθέσιμο, για να θεραπεύσει ή να αποτρέψει την ανθρώπινη ασθένεια από τον ιό. Επιπλέον, πολλές πτυχές της βιολογίας του ιού δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητές. Το γεγονός αυτό, αποδίδεται κυρίως στην απουσία ενός συστήματος κυτταροκαλλιέργειας ή στην εύρεση ενός κατάλληλου μικρού ζωικού προτύπου για περαιτέρω μελέτη (35, 36). Μόνη εξαίρεση αποτελεί ο νοροϊός των ποντικών (murine norovirus), ο οποίος είναι το μόνο μέλος του γένους των νοροϊών το οποίο αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε πρωτογενή καλλιέργεια μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων σχηματίζοντας πλάκες σε RAW264.7 κύτταρα, μια συνεχή κυτταρική σειρά με μορφολογία μακροφάγων ποντικίου (37).

1.3.2 Γονιδιακή οργάνωση

Η λεπτομερής κατανόηση της γονιδιακής οργάνωσης του ιού άρχισε να διευκρινίζεται περίπου το 1990, όταν οι Jiang και Estes κλωνοποίησαν (38) και αλληλούχισαν το γένωμα του ιού. Πρόκειται για ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, περίπου 7.700 βάσεων το οποίο περιλαμβάνει τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), που κωδικοποιούν και τα δομικά και τα μη δομικά γονίδια (εικ. 3). Το ιικό RNA, συνδέεται ομοιοπολικά με μια προερχόμενη από τον ιό πρωτεΐνη γνωστή ως VPg, η οποία παρέχει ένα κάλυμμα στο 5' άκρο και εικάζεται ότι μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην μεταφορά του γονιδιώματος στις περιοχές της αρνητικής σύνθεσης των κλώνων, ενώ στο 3' άκρο του γονιδιώματος εμφανίζεται μια πολυA ουρά (39). Το ORF1 είναι πάνω από 5 KB και αποτελεί τα πρώτα δύο τρίτα του γονιδιώματος (εικ. 3). Το τελικό ένα τρίτο του γονιδιώματος αποτελείται από τις δύο δομικές πρωτεΐνες, την ORF2, η οποία είναι περίπου 1,8 KB και κωδικοποιεί την 57 kDa δομική καψιδική πρωτεΐνη VP1 και την ORF3 που είναι 0,6 KB και κωδικοποιεί μια μικρότερη δευτερεύουσα βασική πρωτεΐνη των 22 kDa, στην οποία αποδίδεται η συσκευασία του γονιδιώματος σε ιοσωμάτια (εικ. 3).



Εικ. 3. Η γονιδιακή δομή και οι περιοχές του καψιδίου των νοριών.

Το γονιδίωμα των νοριών αποτελείται από τρία ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης: ORF1, που κωδικοποιεί τις μη δομικές πρωτεΐνες (ανοικτό μπλε), ORF2 και ORF3 που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες (κίτρινο) συμπεριλαμβανομένης της VP1, η οποία είναι η σημαντικότερη καψιδική πρωτεΐνη και της VP2, που είναι η δευτερεύουσα δομική πρωτεΐνη. Το μη δομικό πολυπρωτεϊνικό μέρος υποβάλλεται σε επεξεργασία από την ιική Pro (3C- like protease) σε έξι ώριμες πρωτεΐνες: τη N-term, τη N-terminal πρωτεΐνη, τη NTPase, την p20 της οποίας η λειτουργία παραμένει άγνωστη και την VPg, η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γονιδιώματος. Η σημαντικότερη πρωτεΐνη η VP1 του καψιδίου διαιρείται περαιτέρω σε δύο κύριες περιοχές, την περιοχή κελύφους (S) και την περιοχή του προεξέχοντος βραχίονα (P). Η περιοχή P διαιρείται περαιτέρω σε P1 και P2. Μια εύκαμπτη περιοχή εμφανίζεται στον σχηματισμό του κελύφους και της P1. Περιοχή κελύφους πράσινο, P1 σκούρο μπλε P2 κόκκινο και εύκαμπτος σύνδεσμος πορτοκάλι.

1.3.3 Δομή ιοσωματίου

Ένας σημαντικός περιορισμός για την περαιτέρω έρευνα πάνω στους νοριούς αποτελεί η έλλειψη ενός λειτουργικού συστήματος κυτταροκαλλιέργειας ή ενός μικρού ζωικού προτύπου. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένα συστήματα έκφρασης, τα οποία έχουν ως σκοπό την άφθονη παραγωγή της καψιδικής πρωτεΐνης, η οποία μπορεί και μετατρέπεται αυτόματα σε ιικά σωματίδια (virus-like, VLPs). Τα μόρια VLPs είναι μορφολογικά και αντιγονικά όμοια με τον εγγενή ιό (40, 41), περιέχουν δηλαδή τις σημαντικότερες ανοσοποιητικές και αντιγονικές ιδιότητες των στελεχών του ιού που αντιπροσωπεύουν και όταν παράγονται σε επαρκείς ποσότητες, αποτελούν σημαντικά αντιδραστήρια για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ιού και των μορίων στόχων.

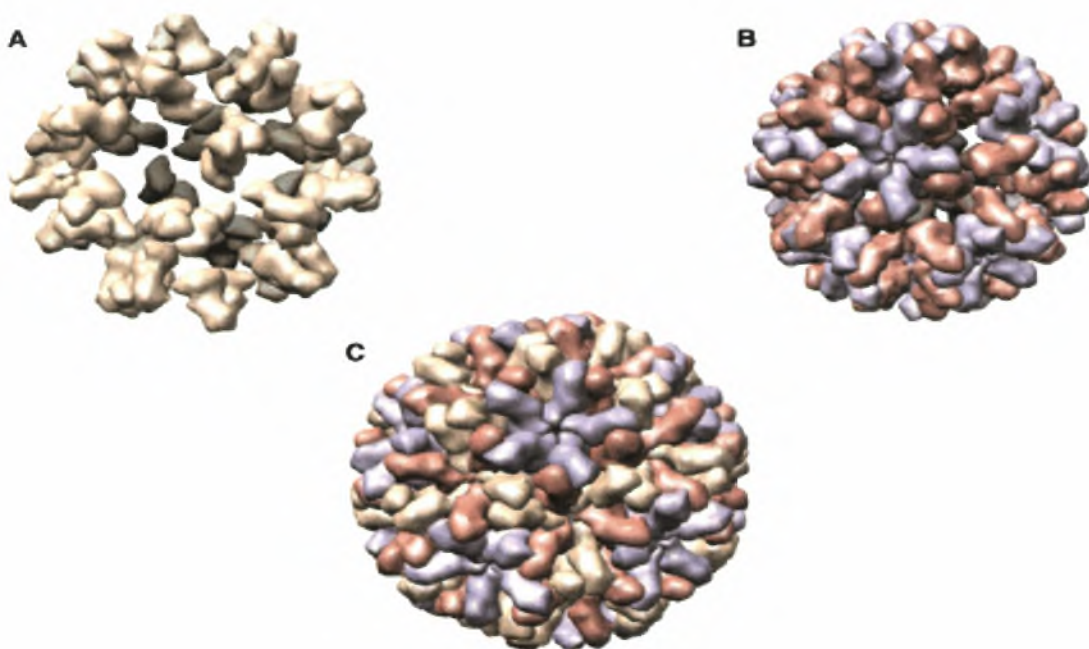
Δύο συστήματα έκφρασης έχουν ξεχωρίσει μέχρι στιγμής, το Baculovirus replicon και το Venezuelan equine encephalitis (VEE) replicon (42). Το σύστημα replicon Baculovirus χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ενός VLP του ιού του Νόργουωκ (NV) (GI.1). Ο ιός που προέκυψε χαρακτηρίστηκε με την βοήθεια της Cryo – EM (κρυο – ηλεκτρονική μικροσκοπία), της κρυσταλλογραφίας ακτίνας X και της

υπολογιστικής απεικόνισης και αποκάλυψε τη δομή του καψιδίου των νοριών (43, 44) (εικ 5). Η κρυσταλλική δομή του ιού, έδειξε ότι το ιικό καψίδιο συγκροτείται χρησιμοποιώντας 180 αντίγραφα της καψιδικής πρωτεΐνης, τα οποία οργανώνονται σε 90 διμερή με μια εικοσαεδρική συμμετρία $T=3$ (44). Επιπλέον, ευδιάκριτα διμερή ενώνονται και διαμορφώνουν μια υψηλότερη δομή προσδίδοντας στο μόριο το σχήμα κυπέλλου (43) (εικ. 5).

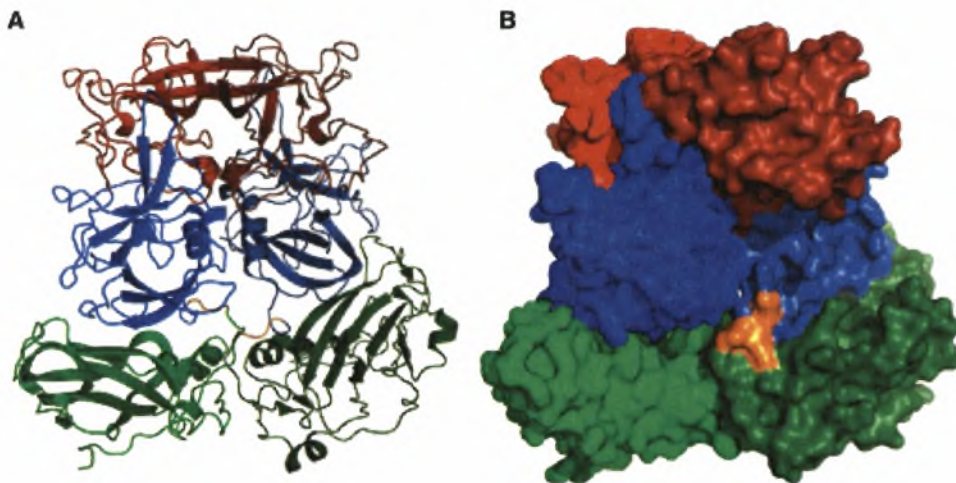
Έτσι, τα C:C διμερή επιτελούν σημαντικό ρόλο για τη διαμόρφωση του εσωτερικού κοχυλίου, του καψιδίου (εικ.5A), ενώ τα A:B διμερή επεκτείνονται πέρα από την επιφάνεια (εικ. 5B, 6A και 6B). Το πλήρες καψίδιο (εικ. 5C) εκμεταλλεύεται την στρατηγική αυτή και διαμορφώνει ένα σφιχτό ιικό καψίδιο με τις απαραίτητες προεξοχές στην επιφάνεια, οι οποίες μπορούν και αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό υποδοχέα, καταστώντας έτσι εφικτή την ιική πρόσδεση και είσοδο (εικ. 5C).

Το μονομερές διαιρείται περαιτέρω σε δύο περιοχές γνωστές ως περιοχή κοχυλίων (S), η οποία διαμορφώνει τον εσωτερικό πυρήνα και την προεξέχουσα περιοχή (P), που συνδέεται με μια εύκαμπτη άρθρωση (εικ. 4A και B). Η περιοχή P διαμορφώνει τις χαρακτηριστικές προεξοχές που εκτείνονται μακριά από τη δομή (43) και διαιρείται με την σειρά της σε δύο υποπεριοχές (εικ. 6A και 6B). Οι υποπεριοχές αυτές περιλαμβάνουν, την P1 (αμινοξέα 226-278 και 406-520), που ενεργεί ως περιοριστική περιοχή μεταξύ του S και της δεύτερης P κατηγορίας και την P2, η οποία είναι η περισσότερο εκτεθειμένη περιοχή της καψιδικής πρωτεΐνης (αμινοξέα 279-405) (43) (εικ. 1 και 6A και 6B).

Η ακολουθία της P2 είναι η πιο μεταβλητή περιοχή στο γονιδίωμα των νοριών, περιέχει την περιοχή δέσμευσης υδατανθράκων (S) και ένα μοτίβο παρόμοιο με μια RNA – δεσμεύουσα περιοχή (43, 45-47).



Εικ.5. Δομικές υπομονάδες του NV VLP. Για τον σχηματισμό του VLP απαιτείται η αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών διμερών. (Α) Η C:C αλληλεπίδραση των διμερών διαμορφώνει τον σχηματισμό «σφιχτό κοχύλι», (Β) A:B διμερή, (C). Τα A:B διμερή εισέρχονται στον σχηματισμό C:C σχηματίζοντας ένα σφιχτό καψίδιο με προεξοχές.



Εικ. 6. Οι περιοχές και οι υποπεριοχές του καψιδικού μονομερούς NV. Το A:B διμερές, αποτελείται από δύο μονομερή, το ένα από την αλυσίδα A, παρουσιάζεται στις «ανοιχτές» σκιές και η αλυσίδα B παρουσιάζεται στις σκοτεινότερες σκιές. Το μονομερές διαιρείται σε δύο περιοχές, την περιοχή σχηματισμού κοχύλι (πράσινη) και τις προεξέχουσες περιοχές (P). Η περιοχή P διαιρείται περαιτέρω σε P1 (μπλε) και P2 (κόκκινο). Η P1 είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση του διμερούς, ενώ η P2 είναι η περισσότερο εκτεθειμένη υποπεριοχή του ιού. Η εύκαμπτη περιοχή (πορτοκαλί) που βρίσκεται μεταξύ της S και της P περιοχής επιτρέπει την ευελιξία για τη διαμόρφωση του σχηματισμού του καψιδίου. (Α) απεικόνιση του A:B διμερούς και (Β) απεικόνιση της επιφάνειας του A:B διμερούς.

1.3.4 Μετάφραση, επεξεργασία και λειτουργία των ιικών πρωτεϊνών

Η ORF1 πρωτεΐνη, μεταφράζεται σε μία μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία αυτοδιασπάται σε έξι μη δομικές πρωτεΐνες από την ιική 3C – κυστεϊνική πρωτεϊνάση (εικ.1). Τα επεξεργασμένα πρωτεϊνικά προϊόντα από το N – άκρο προς C – άκρο περιλαμβάνουν τα εξής: μία N – τελική πρωτεΐνη (p48) μεταξύ 37 – 48 kDa, μια 2C –νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase) περίπου 40 kDa, μια 3A πρωτεΐνη περίπου 20 kDa (p20), την VPg πρωτεΐνη (16 kDa) η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο 5' άκρο του γονιδιώματος, την 3C πρωτεϊνάση (Pro) 19 kDa και την 3D – RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (Pol) μεγέθους 57 kDa (49), (εικ. 1).

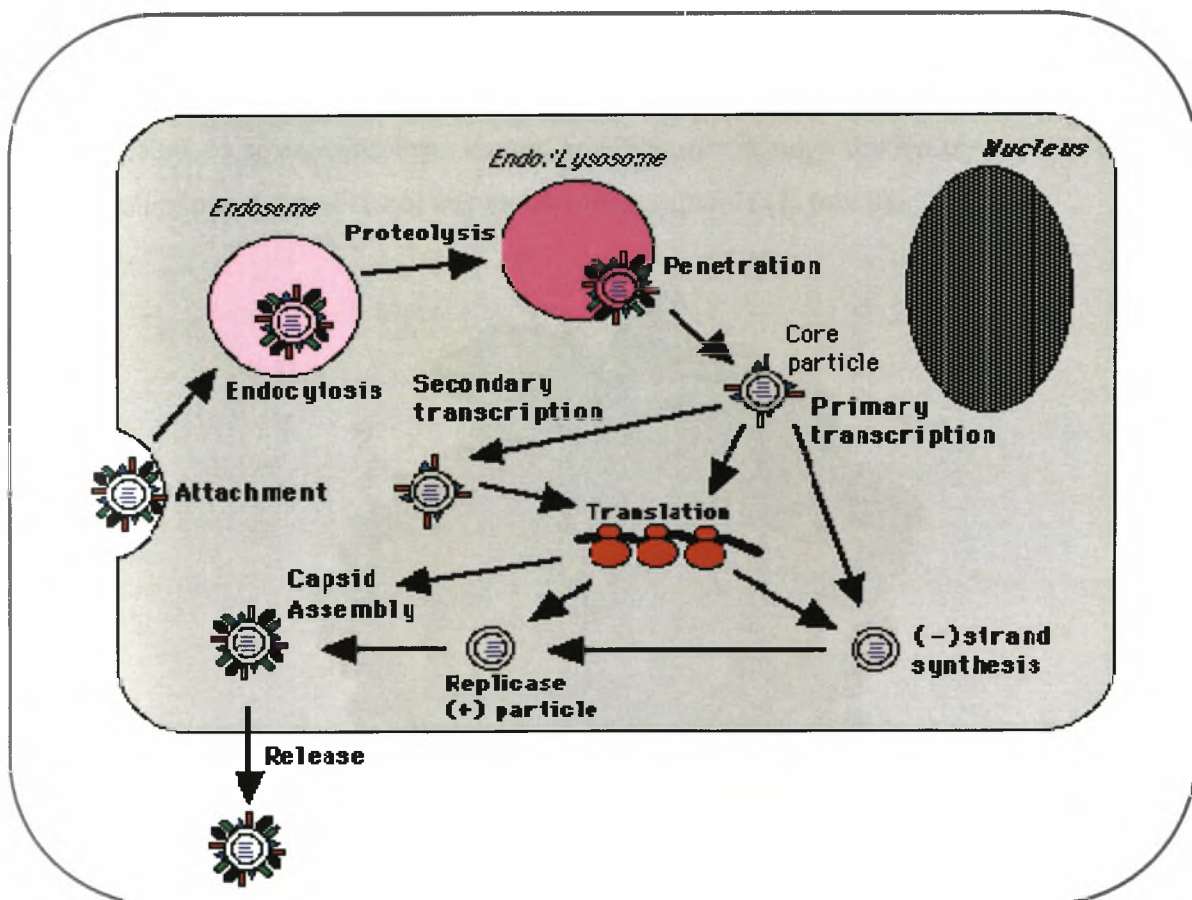
Η λειτουργία της N – τελική πρωτεΐνης (p48) παραμένει ακόμη άγνωστη, ωστόσο, η έκφραση της p48 *in vitro* εντοπίστηκε στην συσκευή Golgi των κυττάρων, οδηγώντας έτσι, στην υπόθεση ότι παίζει ρόλο στην μεμβρανική αναδιάταξη και στην ενδοκυττάρια κίνηση (50, 51). Η νουκλεοτιδική τριφωσφατάση (NTPase) δεσμεύει και υδρολύει NTPs, ενώ η VPg πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την μεταγραφή και είναι πολύ πιθανό πως παίζει ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης, όπως έχουν δείξει πρόσφατες μελέτες (52 – 56).

Η πρωτεάση (Pro), μοιράζεται ομοιότητες με την κυτταρική χυμοθρυψίνη-like πρωτεάση σερίνης (56) και περιέχει την ίδια αλληλουχία αμινοξέων που έχουν βρεθεί και στην 3C πρωτεϊνάση των *picornavirus*. Επίσης, επεξεργάζεται την πολυπρωτεΐνη ORF1 των νοριών στις μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες, (57 – 60). Η ενεργή πλευρά της Pro περιλαμβάνει την καταλυτική ομάδα των His30, Glu54 και Cys139, που εντοπίζονται στο κέντρο μίας βαθιάς σχισμής μεταξύ του N και του C τελικού άκρου όπου ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου (61 – 63). Η His 157, είναι απαραίτητη στο υπόστρωμα πρόσδεσης (64). Η πρωτεάση (Pro), εκτός από τον βασικό της ρόλο στην επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης, εμποδίζει την κυτταρική μετάφραση διασπώντας συγκεκριμένες περιοχές των κυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένουν τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και το RNA (64).

Η Pol των νοριών, έχει αποδειχτεί ότι είναι θεμελιώδης για την *in vitro* ιική αντιγραφή και εντάσσεται σαν μέλος της οικογένειας των Gly–Asp–Asp (GDD) πολυμερασών, όπου ανήκουν και πολλοί άλλοι θετικής πολικότητας RNA ιοί (65). Οι λειτουργίες της ιικής Pol στην αντιγραφή του ιικού γενώματος, για την σύνθεση του RNA, πραγματοποιούνται με την χρησιμοποίηση ενός VPg – εκκινητικού μηχανισμού και της πολυαδενυλιωμένης ουράς στο 3' άκρο ως εκμαγείο (65).

1.3.5 Αντιγραφή του ιικού RNA

Αν και οι νοροϊοί περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1972 (66, 67), ο μηχανισμός αντιγραφής του ιού παραμένει, εν μέρει, άγνωστος. Πιστεύεται ότι το γενωμικό RNA λειτουργεί ως εκμαγείο για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου, ο οποίος τελικά χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ολόκληρου του θετικού RNA γενώματος, το οποίο χρησιμοποιείται με την σειρά του για την παραγωγή νέων ικών σωματιδίων και για την παραγωγή υπογενωμικών RNA, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα, ότι κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του γενωμικού θετικού κλώνου και του υπογενωμικού RNA, η πολυμεράση ουριδυλιώνει την VPg πρωτεΐνη, παρουσία του πολυαδενυλιωμένου γενωμικού RNA και έτσι η VPg διεγείρει την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Η πολυμεράση δεν απαιτεί εκκινητικά μόρια για την αντιγραφή του αρνητικού κλώνου RNA. Ακολούθως, η αντιγραφή του γενωμικού RNA εντοπίζεται στην περιοχή συγκρότησης, οδηγούμενη πιθανόν από τοπικά σήματα στην ORF1 γενωμική περιοχή (68), όπου και πακετάρεται σε ιοσωμάτια.



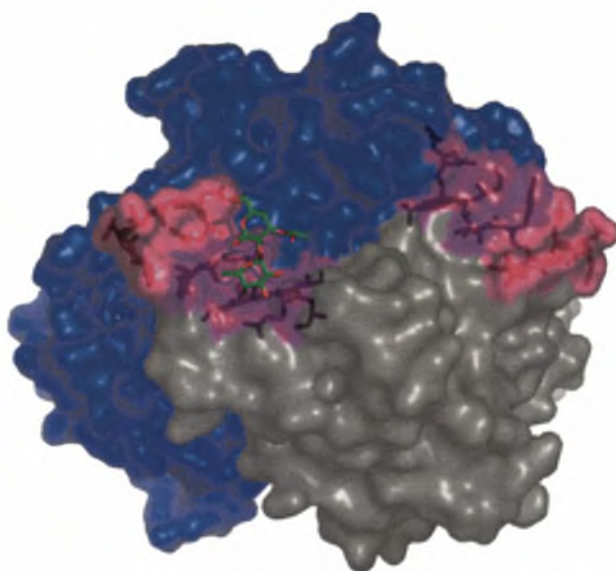
Εικ. 7. Προτεινόμενη στρατηγική αντιγραφής (70)

Τα επόμενα στάδια της συναρμολόγησης του ιικού σωματιδίου, της ωρίμανσης και της περαιτέρω απελευθέρωσης του από το κύτταρο ξενιστή δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά. Έχει αποδειχθεί ότι τα VPg – συνδεδεμένα γενωμικά και υπογενωμικά RNA μόρια δεν συσκευάζονται μαζί στο ίδιο ιοσωμάτιο, αφού σε πειραματικές προσεγγίσεις βρέθηκε, ότι υπάρχει το κάθε είδος μορίου σε σωματίδια διαφορετικών πυκνοτήτων (69).

1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.4.1 Πρόσδεση στον υποδοχέα

Οι αρχικές αλληλεπιδράσεις των νοροϊών με τα κύτταρα ξενιστές, δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο του ιού στα κύτταρα, αποτελεί η αναγνώριση του υποδοχέα στην επιφάνεια τους. Συγκεκριμένα, η σύνδεση των νοροϊών με τα κύτταρα ξενιστές περιλαμβάνει την αλληλεπίδρασή τους με ειδικούς υδατανθρακικούς (Histoblood Group Antigens) υποδοχείς (71). Η ικανότητα των νοροϊών να προσδένονται στους HBGAs υποδοχείς, πιθανολογείται ότι καθορίζεται από ειδικά αμινοξέα, τα οποία εντοπίζονται στην P2 υποπεριοχή του καψιδίου, όπως περιγράφηκε και για την P δομική περιοχή του στελέχους VA387 με το σύμπλοκο A (συνθετικό) και τον B τρισακχαρίδιο (47) (εικ.8).



Εικ.8. Η δομή της P περιοχής ενός καψιδίου GII.4 σε σύνδεση με τον υποδοχέα. Για κάθε A:B διμερές που αλληλεπιδρά, υπάρχουν δύο πανομοιότυπες περιοχές σύνδεσης που διαμορφώνονται από δύο ευδιάκριτες περιοχές στην εκτεθειμένη επιφάνεια. Η περιοχή I (μωβ), αλληλεπιδρά άμεσα με την

ομάδα της φουκόζης του Β-τριμερούς, διαμορφώνοντας ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου. Η περιοχή 2 (ροζ), παρέχει τις απομακρυσμένες αλληλεπιδράσεις, που σταθεροποιούν τη δέσμευση. Β-τριμερές: πράσινο, αλυσίδα Α: μπλε, Αλυσίδα Β: γκριζο. (47)

1.4.2 Ο πολυμορφικός υποδοχέας των νοριών

Τα ιικά μόρια VLPs, έχει πειραματικά αποδειχτεί, ότι μπορούν και ενώνονται με τους υδρογονάνθρακες ABH HBGA, οι οποίοι αποτελούν σημαντικά μόρια για την ιική περάτωση της μόλυνσεως *in vivo* (72 – 78). Οι υδρογονάνθρακες αυτοί, ανήκουν στην οικογένεια ενός συμπλέγματος πολυσακχαριδίων, το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων και εκφράζεται στο εντερικό και αναπνευστικό επιθήλιο. Επίσης, έχουν βρεθεί και σε άλλες ανθρώπινες βιολογικές εκκρίσεις, όπως τη σίελο (78). Η έκφραση των HBGA, ρυθμίζεται από ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων, τα οποία και καθορίζουν ποιο από τα τρία βιοχημικά μονοπάτια θα ακολουθήσουν. Αυτή η ποικιλία επιλογής, οδηγεί στο πολυμορφικό σύστημα ABO, στο Lewis και στην ποικιλία φαινοτύπων (εικ. 9). Η σύνθεση των HBGA ξεκινάει με έναν πρόδρομο δισακχαρίτη (Galb1-3GlcNAc, μονοπάτι 1) όπου στην συνέχεια του προστίθενται, διαδοχικά, μονοσακχαρίτες από διαφορετικές γλυκοσυλτρανσφεράσες (glycosyltransferases). Το γονίδιο FUT3, γνωστό και ως ένζυμο Lewis, κωδικοποιεί μια fucosyltransferase, η οποία προσθέτει κατάλοιπα φουκόζης στους 1,3 ή 1,4 συνδέσμους του πρόδρομου μορίου, οδηγώντας έτσι, στην σύνθεση του τρισακχαριδίου (Lea) του Lewis A φαινοτύπου. Για να πραγματοποιηθεί το μονοπάτι και να ολοκληρωθεί ο φαινότυπος, απαραίτητη είναι η συμμετοχή του FUT2 γονιδίου, που κωδικοποιεί με την σειρά του μια fucosyltransferase, η οποία προσθέτει μονοσακχαρίτες στη σύνδεση 1,2, δημιουργώντας τελικά το αντιγόνο H τύπου 1. Η παρουσία ή απουσία των FUT2 ή FUT3 αλληλόμορφων γονιδίων σε έναν οργανισμό, μπορεί να καθορίσει το εάν θα είναι επιρρεπής στην προσβολή από νοριό και σε ποιο βιολογικό σύστημα (79), (πίνακας 2).

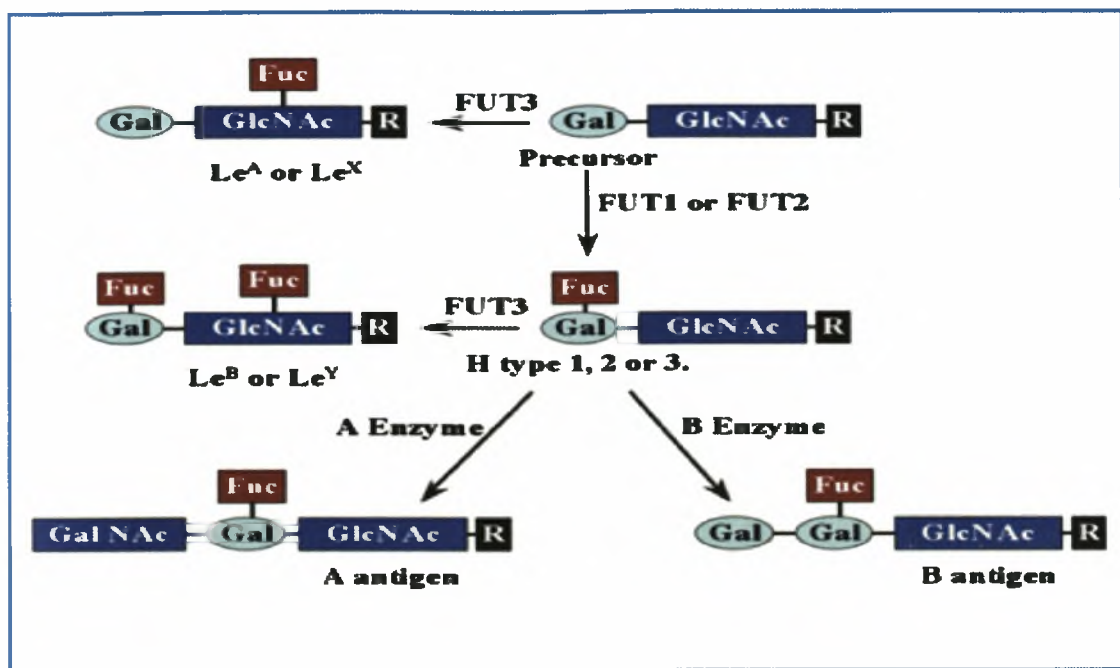
Πίνακας 2 Ενδεικτική λίστα από VLPs ιικά μόρια και συνθετικά HBGAs

VLP	GG	Year	Le ^A	H1	Le ^B	A	B	H3	Le ^X	Le ^Y
Norwalk	I.1	1968		X	X	X		X		
West Chester	I.1	2001						X		
SoV	I.2	1999	X					X		
DSV	I.3	1999	X			X				
Chiba	I.4	2000	X							
HV	II.1	1971				X				
Weisbaden	II.1	2001								
SMV	II.2	1976						X		
Buds	II.2	2002								
Ina	II.2	2002								
TV	II.3	1999				X		X		
GII.4.1987	II.4	1987						X		X
GII.4.1987.D393G	II.4	2007*				X	X	X		
GII.4.1997	II.4	1997				X	X	X		X
GII.4.2002a	II.4	2002		X		X			X	
GII.4.2002	II.4	2004						X		X
GII.4.2004	II.4	2004								
GII.4.2005	II.4	2005								
GII.4.2006	II.4	2006				X	X	X		
M7	II.4	1999								
MNV	V	2004								

VLP, virus-like particle; GG, genogroup and genocluster.

*A mutant generated in 2007.

Από τα κρούσματα προσβολής του ιού σε πληθυσμούς, καθώς και από πειράματα πρόκλησης της προσβολής του ιού στον ανθρώπινο οργανισμό, έχουν προκύψει σημαντικές ενδείξεις ότι οι υδρογονάνθρακες HBGAs αποτελούν έναν φυσικό υποδοχέα ή τουλάχιστον ένα απαραίτητο συνπαράγοντα για την εισβολή του ιού (77, 80 – 82). Πρόσφατες μελέτες στους νοριοιούς, έδειξαν ότι κάποιοι ανθρώπινοι οργανισμοί δεν μπορούν να προσβληθούν από τον ιό και ενισχύθηκε η υπόθεση ότι, η «ανοσία» ως προς τη μόλυνση δεν οφειλόταν σε πιθανά αντισώματα τα οποία προϋπήρχαν στον κάθε οργανισμό (83 – 85). Συγκεκριμένα, σε μία από αυτές τις μελέτες παρατηρήθηκε ότι όταν από κάποιο οργανισμό λείπει ο ειδικός φαινότυπος, εμφανίζεται ανοχή στην μόλυνση από νοριοίό (77). Ακόμη πιο πρόσφατες μελέτες, δείχνουν ότι οργανισμοί με ομάδα αίματος 0 είναι πιο επιρρεπείς στην μόλυνση, σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες (81). Σε αντίθεση των παραπάνω, σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε ότι τα άτομα που δεν είχαν τον συγκεκριμένο φαινότυπο, εμφάνιζαν σημαντικά χαμηλότερο τίτλο αντισωμάτων στα στελέχη του ιού (GII.4), σε σχέση με τα άτομα που είχαν τον φαινότυπο (87) και ότι άτομα τα οποία είχαν ομάδα αίματος B, εμφάνιζαν λιγότερες επιπτώσεις από την μόλυνση του ιού (GI) (82).



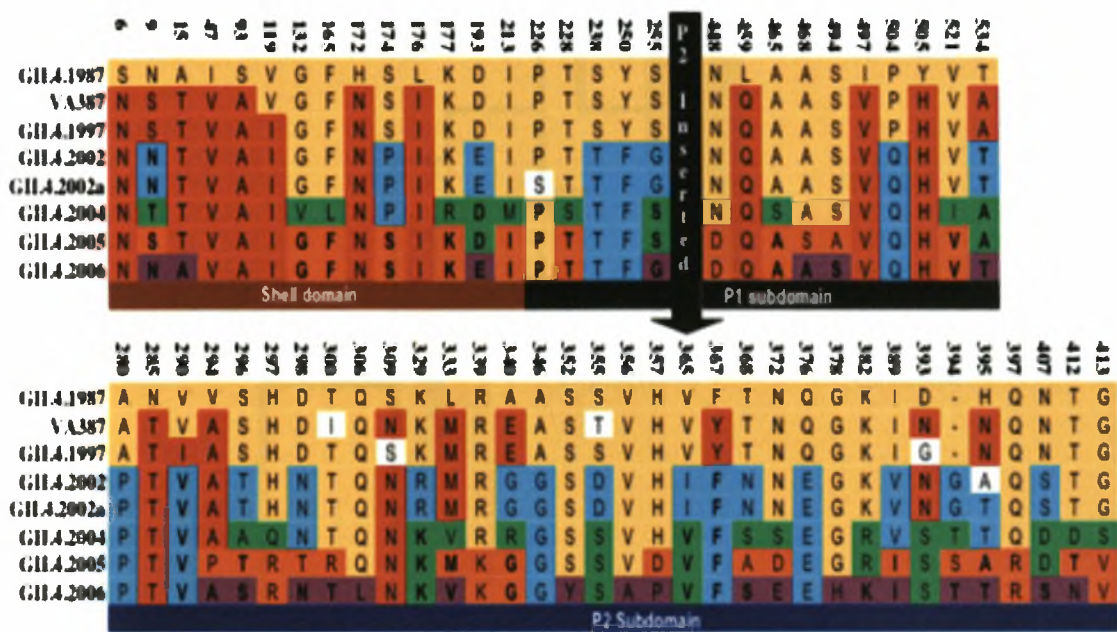
Εικ.9. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των HBGA, με ενζυμικές διαφοροποιήσεις από τα FUT1, FUT2 και FUT3 γονίδια. (Α) Ο τύπος 1,2 ή 3 μπορεί να τροποποιηθεί για να παράγει μια ποικιλία από διαφορετικά αντισώματα από διαφορετικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων των FUT1, FUT2 ή FUT3 και τα A και B ένζυμα. Οι τύποι 1 και 3 έχουν τροποποιηθεί από το FUT2, το οποίο προσθέτει φουκόζη από έναν 1,2 σύνδεσμο στο πρόδρομο μόριο για να παραχθεί το H αντιγόνο, τύπου 1. Το H αντιγόνο μπορεί στην συνέχεια να τροποποιηθεί από το A ή το B ένζυμο για να παράξει τα A ή B αντιγόνα. Στον τύπο 2, το πρόδρομο μόριο τροποποιείται από FUT1 στα ερυθροκύτταρα, ενώ από το FUT2 στο βλεννογόνο. GAL: γαλακτόζη, GlcNAc: N-ακετυλογλυκοζαμίνη, Fuc: φουκόζη, GalNAc: N-ακετυλογαλακτοζαμίνη

1.5 ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ

1.5.1 Η εξέλιξη του καψιδίου

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για να καθοριστεί η ευαισθησία του ανθρώπινου πληθυσμού στους νοροϊούς, συγκρίνοντας στελέχη από διαφορετικές γενετικές ομάδες ή/και διαφορετικές υποομάδες. Έχει προταθεί, ότι τα στελέχη τα οποία υπάγονται σε έναν γενότυπο είναι παρόμοια και ότι οι διαφορές που τυχόν υπάρχουν μεταξύ τους, δεν επαρκούν ώστε να προκαλέσουν μια μοναδική άνοση απάντηση. Εντούτοις, η επικράτηση της GII.4 ομάδας ως κύρια αιτία της μόλυνσης, κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 20 ετών, καθώς και η δυνατότητα αυτής να προκαλέσει πανδημικά κρούσματα σε πληθυσμούς, έχει συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων της. Η ανάλυση της ακολουθίας και η μοριακή φυλογενετική ανάλυση των στελεχών της

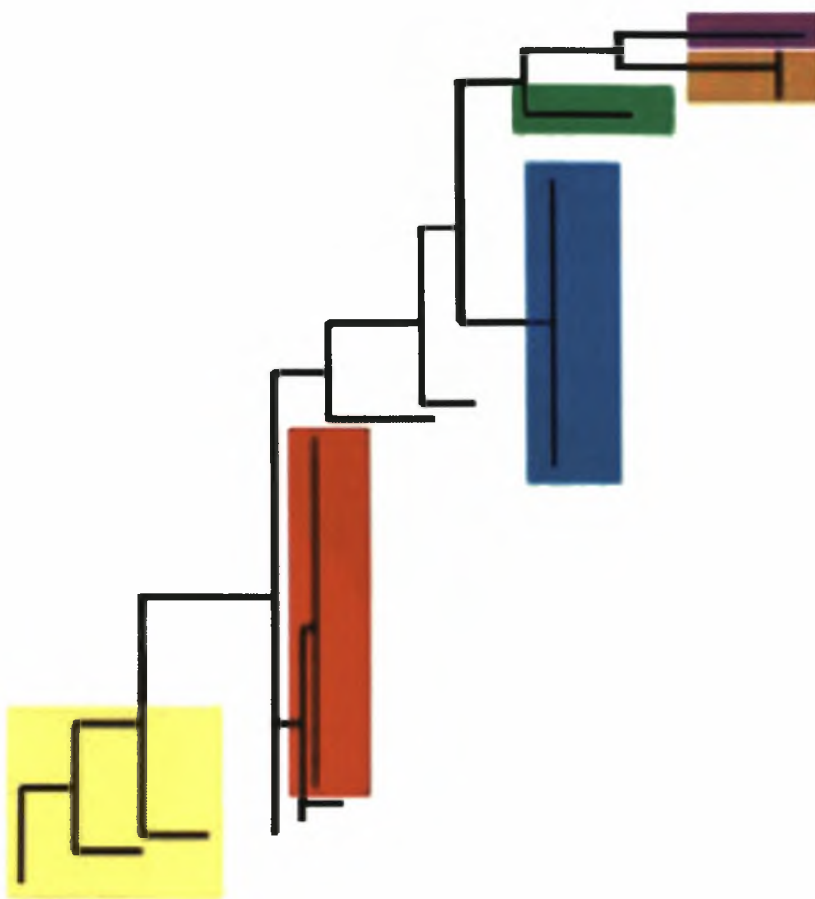
GII.4 ομάδας, έχουν δείξει ότι μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω σε υποομάδες, όπου η κάθε μία σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο πανδημικό κρούσμα (88) (εικ.10 και 11).



Εικ. 10. Κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει τις αλλαγές του αμινοξέος που προέκυψαν μέσα στις υποομάδες. Η ακολουθία του VA387 λήφθηκε ως αναφορά. GII.4.1987, Camberwell κίτρινο GII.4.1997, Grimsby κόκκινο, GII.2002 και GII.2002a Farmington Hills μπλε, GII.2004 Hunter πράσινο, GII.2005 Sakai πορτοκάλι και GII.2006 Minerva μωβ. Τα GII.2002 και GII.2002a είναι αντιπροσωπευτικές ακολουθίες από την υποομάδα Farmington Hills και διαφέρουν μόνο κατά δύο αμινοξέα, ένα από τα οποία εμπίπτει στη P2 περιοχή.

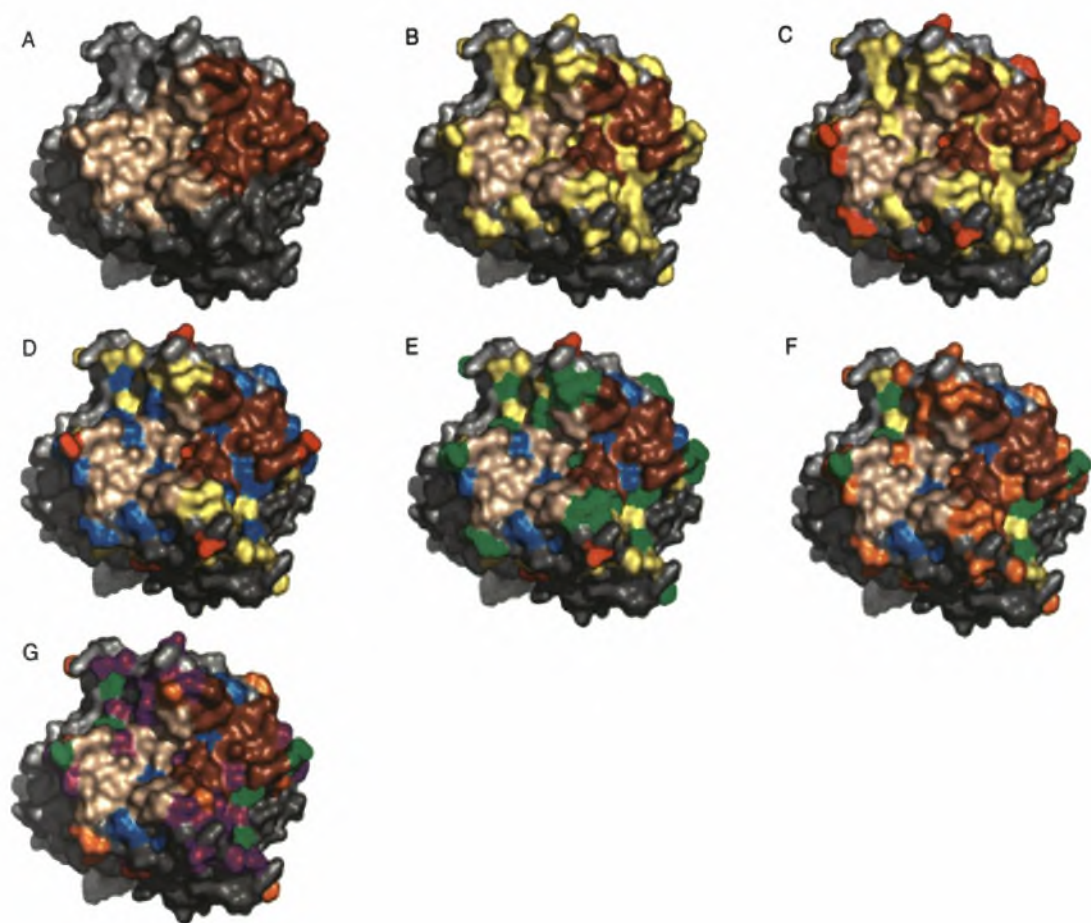
Αυτές οι υποομάδες, περιλαμβάνουν την υποομάδα Camberwell, στην οποία υπάγονται οι ιοί που απομονώθηκαν από το 1987 ως το 1995, την Grimsby 1995 - 2002, την Farmington Hills 2002 - 2004, την Hunter 2004 – 2006, την Sakai 2004 - 2006 (88) και την υποομάδα Minerva η οποία έχει πρόσφατα οριστεί περιλαμβάνοντας ιούς που ανιχνεύθηκαν από το 2006 και μετά. Επειδή η υποομάδα Camberwell θεωρείται ως η αρχική, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί εάν οι ιοί της GII.4 προέκυψαν κατά την δεκαετία του '80 ή ήταν ενδημικοί στους ανθρώπινους πληθυσμούς και προγενέστερα.

Αναλύσεις των φυλογενετικών δέντρων της GII.4 των νορτοιών έδειξαν ότι οι ιοί αυτοί εξελίχθηκαν όντως μέσω της εξέλιξης και πως μερικές υποομάδες τους διατηρήθηκαν για αρκετά έτη (Camberwell και Grimsby) (88, 89 – 91) (εικ. 11).



Εικ. 11. Φυλογενετικό δέντρο της P2 υποπεριοχής που προέκυψε από πολλαπλή ευθυγράμμιση χρησιμοποιώντας το Μπεϋζιανό (Bayesian) πειραματικό συμπέρασμα. Το δέντρο δείχνει ότι και οι έξι υποομάδες είναι ευδιάκριτες και προέκυψαν από την υποομάδα Camberwell. Camberwell κίτρινο, Grimsby κόκκινο, Farmington Hills μπλε, Hunter πράσινο, Sakai πορτοκαλί και Minerva μωβ.

Σε χαρτογράφηση που πραγματοποιήθηκε στη δομή του στελέχους VA387 της GII.4 των νοριών, για την μελέτη της ποικιλομορφίας μεταξύ των υποομάδων αποδείχτηκε, ότι ένα μεγάλο μέρος της ποικιλομορφίας μεταξύ αυτών βρίσκεται μέσα ή κοντά στις περιοχές δέσμευσης (εικ. 12). Από τις παρατηρήσεις αυτές, προέκυψε η υπόθεση ότι, οι μεταβλητές περιοχές επιτρέπουν σε διαφορετικούς ιούς της GII.4 υποομάδας να παρακάμψουν την ανθρώπινη άνοση απάντηση αλλάζοντας τις περιοχές αναγνώρισης των αντισωμάτων (πίνακας 3). Τέλος, σε πιο πρόσφατη μελέτη (88), παρατηρήθηκε ότι η GII.4 ομάδα μπορεί και εξελίσσεται κατά την διάρκεια της ανοσοποιητικής απάντησης.



Εικ. 12. Ποικιλομορφία των ιών GII.4 που χαρτογραφούνται επάνω σε διμερές. Οι δομές τοποθετούνται από αριστερά προς δεξιά, από την κορυφή προς το κατώτατο σημείο: (A) διμερές με δύο πανομοιότυπες κοιλότητες καφε και εκρού (B) Camberwell (GII.4.1987) κίτρινο, (C) Grimsby (GII.4.1997) κόκκινο, (D) Farmington Hills (GII.4.2002) μπλε, (E) Hunter (GII.4.2004) πράσινο, (F) Sakai (GII.4.2005) πορτοκάλι, (G) αλλαγές που εμφανίστηκαν στην υποομάδα Minerva (GII.4.2006) μωβ.

	GII.4 antisera					
VLP	GII.4.1987	GII.4.1997	GII.4.2002a	GII.4.2002	GII.4.2004	GII.4.2005
GII.4.1987	100	60	10	16	12	22
GII.4.1997	100	100	17	46	25	19
GII.4.2002a	2	1	100	4	3	4
GII.4.2002	21	7	19	100	21	28
GII.4.2004	17	8	10	18	100	27
GII.4.2005	24	9	6	17	32	100

Πίνακας 3. Οι ομάδες Camberwell and Grimsby εμφανίζουν παρόμοια αντιγονικότητα, κίτρινο. Farmington Hills μπλε, Hunter πράσινο, Sakai πορτοκάλι. Οι δύο διαφορετικές αποχρώσεις του μπλε δείχνουν δύο διαφορετικούς αντιγονικούς τύπους στη υποομάδα Farmington Hills.

1.5.2 Αντιγονικές παραλλαγές και ανοσοποίηση

Η κατανόηση της εξέλιξης της GII.4 γενετικής ομάδας των νοροϊών είναι ουσιαστική, προκειμένου να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι ιοί αυτοί μπορούν και αποφεύγουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Το πρότυπο της εξέλιξης προτείνει, ότι ένας πληθυσμός προερχόμενος από τον ιό φθάνει σε μια περίοδο φαινοτυπικής στασιμότητας, κατά την διάρκεια της οποίας, μπορούν να συσσωρευτούν ουδέτερες μεταλλάξεις, οι οποίες δεν ασκούν καμία επιρροή στην λειτουργία του ιού (88, 89 – 91). Ο προερχόμενος ιικός πληθυσμός περνά ένα διάστημα κατέχοντας ουδέτερες μεταλλάξεις, ώσπου τελικά να εμφανιστεί μια σπάνια μετάλλαξη και να επιτρέψει στον ιό να αρχίσει και πάλι να πολλαπλασιάζεται. Το σύνολο της διαδικασίας αυτής προκαλεί ένα τελικό εκλεκτικό «ξεκαθάρισμα» των ουδέτερων μεταλλάξεων που είχαν συσσωρευτεί πριν από την καθοριστική μετάλλαξη και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, χωρίς να ασκηθεί επίδραση στην λειτουργική ικανότητα του ιού (88, 89 – 91) ή να συμβάλλει στην αλλαγή του φαινοτύπου.

Σήμερα, ο συσχετισμός μεταξύ της γενετικής και φαινοτυπικής διαφοροποίησης παραμένει μια σημαντική εκκρεμής ερώτηση, όσον αφορά τους ιούς της γρίπης, της ηπατίτιδας C, της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας και τους νοροϊούς. Η ερμηνεία των θεμελιωδών νόμων που διέπουν την αντιγονική διαφοροποίηση είναι σημαντική, για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίον οι ιοί καταφέρνουν να παρακάμπτουν την ανθρώπινη άνοση απάντηση. Η επίτευξη του παραπάνω στόχου θα δημιουργήσει την βάση για την πιθανή πρόβλεψη των μελλοντικών στελεχών, με απώτερο σκοπό τη σχεδίαση αποτελεσματικών εμβολίων.

Κατά τη διάρκεια της εμφάνισης των ομάδων Camberwell και Grimsby, εμφανίστηκαν δύο ευδιάκριτες περίοδοι φαινοτυπικής στασιμότητας. Η ομάδα Camberwell επικράτησε από το 1987 ως το 1995, εμφανίζοντας ελάχιστη μεταβλητότητα. Εντούτοις σήμερα, πολύ λίγες ακολουθίες είναι διαθέσιμες από αυτήν την υποομάδα, με αποτέλεσμα, η εξελικτική της εικόνα να είναι ελλιπής. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η Camberwell αποτελεί την πρώτη ομάδα των ιών GII.4. Η μετάλλαξη που εμφανίστηκε στην ομάδα Grimsby οδήγησε σε αλλαγές στο καψίδιο, επιτρέποντάς της την πρόκληση προσβολής σε μια αυξανόμενη σειρά ξενιστών. Κατά παράδοξο τρόπο, οι ομάδες Camberwell και Grimsby συνδυάζονται μεταξύ τους, αντιπροσωπεύοντας έτσι μια ενιαία εποχή αντιγονικής στασιμότητας, κυρίως λόγω

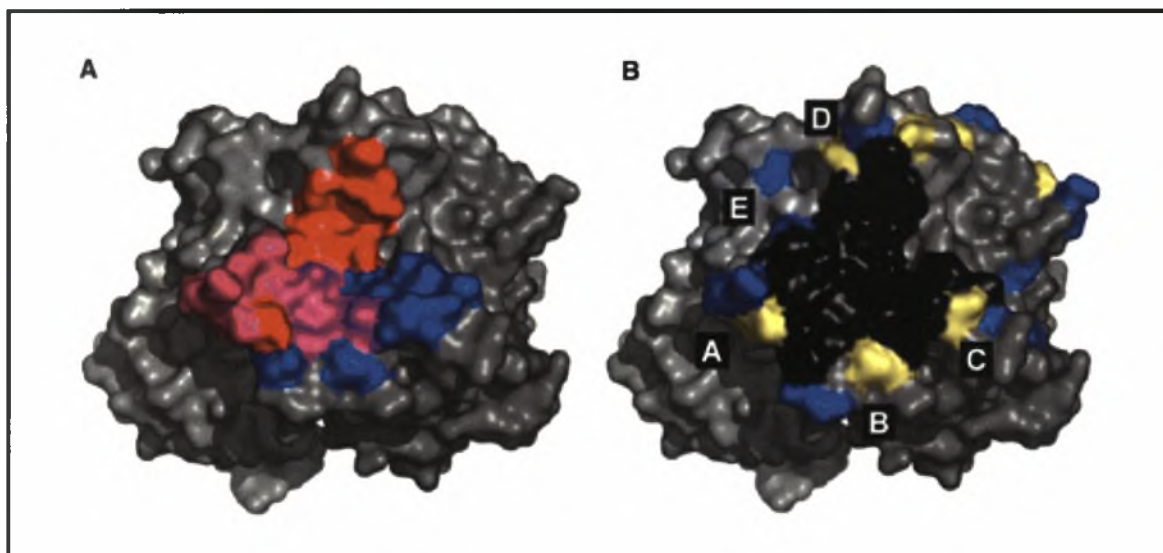
της απουσίας εμφάνισης ανιχνεύσιμης ανοσοποιητικής αλλαγής στους ιούς GII.4 από το 1987 ως το 2000, παρά του ότι 19 σχετικές αλλαγές αμινοξέων εμφανίστηκαν στο καψίδιο κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Η αλλαγή, αυτή μπορεί να αποτελεί παράγοντα για την απουσία ανοσίας στους πληθυσμούς. Η ομάδα Grimsby, πιθανώς, εξελίχθηκε, με αποτέλεσμα την μόλυνση μιας πρόσθετης ομάδας του πληθυσμού, παρατείνοντας έτσι και την περίοδο της αντιγονικής στασιμότητας και μη επιτρέποντας τους ιούς GII.4 να διατηρήσουν τις αντιγονικές τους ιδιότητες. Οι ιοί από την Grimsby ομάδα προκάλεσαν μια σημαντική πανδημία, γεγονός που έδειξε ότι ένα μεγάλο ποσοστό του ευπαθούς πληθυσμού πιθανόν μολύνθηκε και συνεπώς ανέπτυξε ανοσία. Δεδομένου ότι η ανοσία αυξήθηκε, η φύση του ιού επέβαλλε και την αύξηση αλλαγών του, οδηγώντας έτσι σε ένα νέο φαινότυπο, ο οποίος εντοπίστηκε στην υποομάδα Farmington Hills.

Μια χαρακτηριστική διαφορά που σημειώθηκε κατά τη διάρκεια της εμφάνισης της ομάδας Farmington Hills, ήταν ένα μονό ένθετο αμινοξέων αμέσως μετά από τη θέση 393 στη P2 περιοχή. Η αλλαγή αυτή διατηρήθηκε σε όλες τις πρόσφατες ομάδες, ενώ σημειώθηκαν και δύο διαφοροποιήσεις στις καψιδικές ακολουθίες, παράγοντας VLPs με μεγάλες διαφορές στις ικανότητες δέσμευσης HBGA καθώς επίσης και στον αντιγονικό φαινότυπο. Οι διαφορές μεταξύ αυτών των ακολουθιών των GII.4-2002 και GII.4-2002a, καθορίζονται από τις αντικαταστάσεις της P1 υποπεριοχής όπου μια προλίνη αντικαθίσταται από μια σερίνη στη θέση 226 και της P2 υποπεριοχής όπου μια αλανίνη αντικαθίσταται από μια θρεονίνη στη θέση 395. Ενώ η αλλαγή στην περιοχή P2 είναι περισσότερο εκτεθειμένη στην επιφάνεια, είναι απίθανο να διευκολυνθεί αυτή η ισχυρή ορολογική αλλαγή σε GII.4-2002a (πίνακας 3), γιατί η αντικατάσταση αυτή βρίσκεται και σε άλλες υποομάδες της GII.4 (εικ. 10). Κατά συνέπεια, η αλλαγή της P1 περιοχής (P226S) καθορίζει έναν σημαντικό αντιγονικό κυρίαρχο επίτοπο (88), ο οποίος είναι η αρχική υπομονάδα ενός άλλου αντιγονικού επίτοπου. Ο αρχικός αυτός αντιγονικός επίτοπος, αναγνωρίζεται ευκολότερα από το ανοσοποιητικό σύστημα των ξενιστών και επομένως έχει μέγιστη επιρροή στην εξειδίκευση των αντισωμάτων.

Αυτή η μορφή άνοσης διαφυγής είναι διαφορετική από την προηγούμενα παρατηρηθείσα, λόγω του ότι μόνο δύο αντικαταστάσεις οδήγησαν σε δύο φαινοτυπικές αλλαγές (νέα αντιγονικότητα και αλλαγμένη σύνδεση HBGA) και καμία από τις πρόσθετες μεταλλάξεις δεν εξαλείφθηκε μαζί τους. Κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι η αντιγονική εξέλιξη εμφανίστηκε μέσα στην υποομάδα

Farmington Hills, διευκολύνοντας την γρήγορη εμφάνιση μιας νέας παραλλαγής, ικανής να προσδεθεί με μια σειρά διαφορετικών HBGAs. Αν και είναι δυνατό κατά τη διάρκεια της στατικής περιόδου δύο πληθυσμοί να σύγκλιναν στην ίδια σπάνια μετάλλαξη που έδωσε τους νέους φαινότυπους, θα ήταν ιδιαίτερα απίθανο τα 18 από τα 20 πρόσθετα αμινοξέα που συνδέονται με την ομάδα Farmington Hills και είχαν συσσωρευτεί τυχαία, να είναι πανομοιότυπα και στους δύο πληθυσμούς. Η πιθανότερη υπόθεση είναι ότι η ομάδα Farmington Hills προέκυψε ως μια μετάλλαξη και στην συνέχεια η αντιγονική εξέλιξη επέτρεψε την αποφυγή της ανοσίας.

Το 2003 μια μελέτη (92), σε ασθενή που είχε προσβληθεί από νοροϊούς της ομάδας GII, έδειξε ότι η αντίδραση αντισωμάτων με τα ιικά σωματίδια μπορεί σταδιακά να οδηγήσει τον ιό σε δημιουργία μεταλλάξεων, κυρίως στο καψίδιο, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του προσβεβλημένου οργανισμού να αναπτύξει ανοσία καθώς επίσης και την μετατροπή της οξείας μόλυνσης σε χρόνια λοίμωξη (92). Στην περίπτωση αυτή, ενώ το άτομο ήταν σοβαρά ανοσοκατασταλμένο (CD4/CD8 0.37), είχε διατηρήσει άθικτη ορολογική άνοση απάντηση με κανονικές συγκεντρώσεις των ανοσοσφαιρινών (Ig), IgG, IgA, και IgM.



Εικ. 13. Πιθανοί επίτοποι στην επιφάνεια των GII.4 ιών.

Όπως και με το ιό της γρίπης, η σχέση μεταξύ της εξέλιξης των νοροϊών και των μοριακών μηχανισμών της αντιγονικής ποικιλομορφίας, οι οποίοι επιτρέπουν τη διαφυγή από την ανοσία, είναι σύνθετοι. Ενώ οι μεταλλάξεις δίνουν αφορμή για εμφάνιση νέων στελεχών, υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι η αντιγονική εξέλιξη

εμφανίζεται και σε μερικές ομάδες, οι οποίες επιτρέπουν τη διαφυγή από την ανοσία ή διευκολύνουν την επέκτασή τους στους προηγούμενους ανθεκτικούς πληθυσμούς. Επιπλέον, έχει εντοπιστεί ότι τουλάχιστον πέντε περιοχές της GII.4 στη καψιδική επιφάνεια της περιοχής P2, λειτουργούν κάτω από θετική επιλογή και αυτές οι περιοχές μπορεί να αντιπροσωπεύσουν τους θεωρητικούς αντιγονικούς επίτοπους (εικ. 13), οι οποίοι ποικίλλουν τόσο, ώστε να επιτρέψουν τη διαφυγή από την ανάπτυξη ανοσίας. Κατά συνέπεια, η εξέλιξη σε επίπεδο πληθυσμών συνδέεται με την αντιγονική εξέλιξη του κάθε ατόμου ξεχωριστά μέσα στον πληθυσμό και μπορεί να παρέχει έναν ισχυρό μηχανισμό με τον οποίο αυτοί οι ιοί ξεφεύγουν της ανοσίας, διαπερνώντας τους προηγούμενους ανθεκτικούς πληθυσμούς και εμμένοντας σε αυτούς. Περαιτέρω μελέτες με κρυσταλλικές δομές των mAbs που δεσμεύονται στους διάφορους επίτοπους της GII.4 του P διμερούς, είναι απαραίτητες, για να διευκρινίσουν τη σύνθετη σχέση μεταξύ της γενετικής ποικιλομορφίας και του αντιγονικού φαινότυπου.

1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η περίοδος επώασης, για την εμφάνιση των πρώτων χαρακτηριστικών συμπτωμάτων, μετά από την προσβολή του ιού στον άνθρωπο, είναι γενικά 24 – 48 ώρες, με τα κλινικά συμπτώματα να διαρκούν από 12 έως 72 ώρες. Η παρουσίαση των συμπτωμάτων μπορεί να παραταθεί σε μερικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα μεταξύ των ηλικιωμένων ή ανοσοκατασταλμένων. Τα συμπτώματα της μόλυνσης του ιού περιλαμβάνουν τα εξής: εμετό (69%), διάρροια (66%), ναυτία (79%), χαμηλό πυρετό (37%) και κοιλιακούς σπασμούς (30%) (93).

Τα προερχόμενα από τον ιό σωματίδια, έχουν ανιχνευθεί μέχρι και 3 εβδομάδες μετά την παύση των συμπτωμάτων. Επίσης, επειδή η μόλυνση από νοροϊό χρειάζεται πολύ χαμηλή μολυσματική δόση και είναι εξαιρετικά σταθερή στο περιβάλλον, η διάδοση του πραγματοποιείται πολύ εύκολα από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Αν και όλοι οι πληθυσμοί είναι ευαίσθητοι στη μόλυνση, οι ηλικιωμένοι εμφανίζονται ως οι πιο ευαίσθητοι στην προσβολή από τον ιό (94, 95). Εκτός από την αυξημένη ευαισθησία των ηλικιωμένων όμως, μεγάλο κίνδυνο διατρέχουν οι πολύ νέοι αλλά και οι ανοσοκατασταλμένοι (96 – 98). Δυστυχώς, η πραγματική νοσηρότητα καθώς και τα ποσοστά θνησιμότητας που προκύπτουν μετά από τις

μολύνσεις του ιού στους πληθυσμούς υψηλού κινδύνου παραμένουν ακαθόριστα, καθώς επίσης και ο αντίκτυπος της μόλυνσης του ιού σε νήπια και στα παιδιά στον αναπτυσσόμενο κόσμο.

Οι μολύνσεις από τον ιό, συνδέονται συχνότερα με την κατανάλωση μολυσμένων τροφών και νερών. Η διάδοση του γίνεται κυρίως μέσω της ανθρώπινης επαφής, της έκθεσης σε μολυσμένα αερολύματα και μέσω τις περιττωματικής οδού (99).

Τις περισσότερες φορές, τα κρούσματα εμφανίζονται μέσα σε ιδρύματα, όπως τα σχολεία, οι ιδιωτικές κλινικές, τα γηροκομεία, τα νοσοκομεία ή σε τοποθεσίες όπου η στενή ανθρώπινη επαφή είναι αναπόφευκτη, όπως σε κρουαζιερόπλοια, σε στρατιωτικά σκάφη ή και στρατιωτικές μονάδες.

Οι γενετικές ομάδες GI και GII και οι άνω των 25 διαφορετικών γενετικών γενοτύπων που αυτές περιλαμβάνουν, αποτελούν την πλειοψηφία των ανθρώπινων παθογόνων. Εντούτοις, τα κρούσματα της GII.4 ομάδας, εμφανίζονται συχνότερα από οποιοδήποτε άλλη (94, 100, 101). Για τον λόγο αυτό, η πλειοψηφία των κρουσμάτων που προέρχονται από τον ιό οφείλονται στον γενότυπο GII.4. Η πανδημία που αυτός προκαλεί, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 90 (102). Κατά τη διάρκεια του 1995-1996, το στέλεχος US95/96 αποτέλεσε αιτία για περίπου των 55% των κρουσμάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες και για περίπου των 85% των κρουσμάτων στις Κάτω Χώρες (103). Μεταξύ του 2000 και του 2004, το στέλεχος US95/96 είχε αντικατασταθεί από δύο GII.4 νέες παραλλαγές. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το στέλεχος Farmington Hills (104) συνδέθηκε τελικά με το 80% των οξέων κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας.

Ταυτόχρονα, στην Ευρώπη, μια νέα ποικιλομορφία των GII.4 και GII.4b, προκάλεσαν κρούσματα κατά τη διάρκεια του χειμώνα, της άνοιξης, και του καλοκαιριού (115, 106). Οι επιπτώσεις των κρουσμάτων του ιού κατά τη διάρκεια του χειμώνα του 2002-2003 έχουν τοποθετηθεί ως οι υψηλότερες, όπως έχει γνωστοποιηθεί και καταγραφεί στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη (94, 107, 108). Το 2004, η ποικιλομορφία του στελέχους GII.4 ανιχνεύθηκε στην Αυστραλία, την Ευρώπη, και την Ασία (106, 109, 110). Το στέλεχος αυτό, αντικαταστάθηκε στις αρχές του 2006 από δύο νέες κυκλοφορούσες ποικιλομορφίες του GII.4 στις Ηνωμένες Πολιτείες, στην Ευρώπη, και στην Ασία (111). Μια από αυτές ήταν η Sakai, η οποία αντιπροσωπεύει ένα καινούργιο παθολογικό στέλεχος της GII.4 και έχει συνδεθεί με τα κρούσματα που εμφανίζονται στις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης στη Νοτιοανατολική Ασία (97). Τα στελέχη που εμφανίζουν ομοιότητες

με το στέλεχος Sakai προσδιορίζονται επίσης στις Ηνωμένες Πολιτείες και τις Κάτω Χώρες. Το δεύτερο παθολογικό στέλεχος, το οποίο προσδιορίστηκε και πάλι στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν το στέλεχος Minerva. Το στέλεχος αυτό, αποδείχτηκε ότι ήταν ταυτόσημο με τα στελέχη τα οποία είχαν απομονωθεί στις Κάτω Χώρες (112).

Κατά τη διάρκεια του 2006, στο εθνικό εργαστήριο Calicivirus των Η.Π.Α. για τον έλεγχο της ασθένειας, εξετάστηκαν με την χρήση της μεθόδου RT-PCR, 761 δείγματα κοπράνων τα οποία προέκυψαν από 126 κρούσματα στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο ιός επιβεβαιώθηκε σε 114 (90%) από αυτά τα κρούσματα και 87 (76%) συνδέθηκαν με τις δύο νέες GII.4 ποικιλομορφίες του ιού (Minerva και Laurens) (113)

1.6.1 Πρόληψη και έλεγχος

Η ανεπαρκής γνώση και κατανόηση του μηχανισμού δράσης των νοροϊών έχει αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων αντιμετώπισης τους. Μέχρι σήμερα, για την πρόληψη της εξάπλωσης της μόλυνσης συνίσταται η απομόνωση των κρουσμάτων από τον πληθυσμό, ενώ η διαχείριση αυτών αντιμετωπίζεται ανά σύμπτωμα, όπως παρεντερική ή δια στόματος χορήγηση υγρών και θεραπεία αποκατάστασης ηλεκτρολυτών (114).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι νοροϊοί, εμφανίζουν μικρή χρονική περίοδο επώασης, η οποία είναι ιδιαίτερα μολυσματική. Παρουσιάζουν χαρακτηριστική σταθερότητα στο περιβάλλον, στο χλώριο, στους όξινους ορούς, στο ξίδι, στο οινόπνευμα και στα μέτρα αποστείρωσης (34). Η διακοπή της μετάδοσης της μόλυνσης, αποτελεί την αρχική στρατηγική για την πρόληψη, ειδικά σε νοσοκομεία και σε κέντρα περίθαλψης ευπαθών ομάδων, όπως παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατασταλμένοι (115).

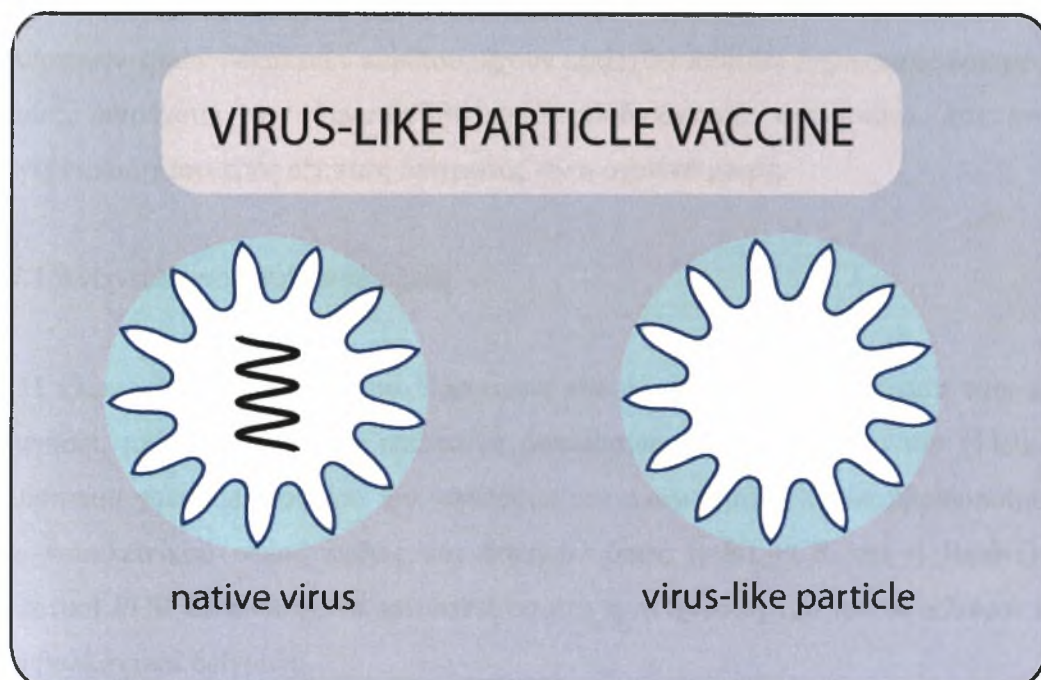
Εξίσου σημαντική είναι η μετάδοση του ιού από δευτεροβάθμιους παράγοντες, όπως η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων και νερών. Στην περίπτωση αυτή, ως αποτελεσματικότερος τρόπος μείωσης της μετάδοσης του ιού αποτελεί η τήρηση κάποιων απλών κανόνων υγιεινής όπως, χρήση σαπουνιού και ζεστού νερού για 20 δευτερόλεπτα. Ως αποτελεσματικά απολυμαντικά θεωρούνται όσα περιέχουν υποχλωριώδη, υπεροξείδιο του υδρογόνου και φαινολικά παράγωγα (116), η πόση εμφιαλωμένου νερού και ποτών χωρίς πάγο κατά την διάρκεια ταξιδιού σε περιοχές όπου η υγιεινή του νερού είναι αμφισβητούμενη, η βρώση τροφίμων που είναι

λεπτομερώς μαγειρευμένα και τέλος, η αποφυγή στενής επαφής με άτομα τα οποία εμφανίζουν στοιχεία της κλινικής εικόνας της μόλυνσης (116).

1.6.2 Εμβόλια

Κύριο εμπόδιο για την επιτυχή δημιουργία αποτελεσματικού εμβολίου έναντι των νοριών, αποτελεί η έλλειψη δυνατότητας κυτταροκαλλιέργειάς τους, η οποία εμποδίζει την ανάλυση του ρόλου των οροεξουδετερωτικών αντισωμάτων και το γεγονός ότι οι ίδιοι οι ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή για την παρασκευή ζωντανού ή αδρανοποιημένου εμβολίου.

Τον Σεπτέμβριο του 2009 σε συνέδριο που πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία, παρουσιάστηκε ένα εμβόλιο κατά των νοριών, το οποίο δεν θα διατίθεται σε ενέσιμη μορφή, αλλά σε μορφή σκόνης. Η κατασκευή του εμβολίου βασίζεται στα μόρια VLP, που αποτελούν πηγή παραγωγής του καψιδιακού αντιγόνου και σε ένα μονοφωσφορικό λιπίδιο A (Monophosphoryl Lipid A) το οποίο ενισχύει την ρινική λήψη (εικ 14).



Εικ. 14. Τα εμβόλια VLP σχεδιάζονται για να μιμηθούν την εξωτερική δομή της πρωτεΐνης έτσι ώστε να προκαλέσουν μια αποτελεσματική άνοση απάντηση. Επειδή τα VLP δεν ενσωματώνουν το ιικό RNA, είναι ανέκτα να αναπαραχθούν στο σώμα και έτσι δεν μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση.

Ήδη, η πρώτη φάση των δοκιμών ασφαλείας έχει ολοκληρωθεί και τα στοιχεία που προέκυψαν, έδειξαν ότι το εμβόλιο δεν εμφάνισε καμιά σοβαρή επιπλοκή ενώ παρείχε την κατάλληλη ανοσοποίηση. Οι δοκιμές έχουν προγραμματιστεί να συνεχιστούν με μια μελέτη πρόκλησης του οργανισμού από ζωντανούς ιούς, προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η ασφάλεια και η ταχύτητα της προστασίας που παρέχει το εμβόλιο κατά της μόλυνσης από νοροϊούς (www.clinicaltrials.gov), (www.ligocyte.com).

Έτσι, με την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου θα μπορέσει να μειωθεί η συχνότητα της επιδημικής ιικής γαστρεντερίτιδας, γεγονός που θα ωφελήσει κυρίως τα άτομα τα οποία υπάγονται στις ομάδες υψηλού κινδύνου, καθώς και τις αναπτυσσόμενες χώρες όπου οι συνθήκες υγιεινής είναι περιορισμένες (117).

1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα σύγχρονα εργαστηριακά τεστ που εφαρμόζονται σήμερα σε επίπεδο ρουτίνας, δεν αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των νοροϊών (118). Έτσι, για την διάγνωση των νοροϊών, κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών περίπου, έχουν εξελιχθεί κάποιες σημαντικές δοκιμές οι οποίες, παρέχουν την δυνατότητα του προσδιορισμού του ακόμα και αν η συγκέντρωση του προς εξέταση δείγματος είναι σχετικά μικρή.

1.7.1 Ανίχνευση νουκλεϊνικού οξέος

Η κλωνοποίηση του ιού του Νόργουικ και η μετέπειτα αλληλούχιση του, έχει οδηγήσει, με επιτυχία, στην ανάπτυξη δοκιμασιών ανίχνευσης του ιού (119). Η γνώση του γονιδιώματος του ιού, επέτρεψε τον σχεδιασμό δοκιμών υβριδοποίησης του νουκλεϊνικού οξέος καθώς και δοκιμών όπως η RT-PCR και η Real-Time ποσοτική PCR έτσι ώστε, να καταστεί εφικτή η ανίχνευση του ιού σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα.

Η RT-PCR αποτελεί την πιο ευαίσθητη διαγνωστική δοκιμή για την ανίχνευση του ιού (119). Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι μπορεί να ανιχνεύσει τα ιικά μόρια σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (100 particles/ml) ακόμα και μετά το πέρας της οξείας κλινικής μόλυνσης. Επίσης, η ανίχνευση των νοροϊών

είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε δείγματα τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στους 4°C και για πολλά χρόνια στους - 70°C (119). Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία της, καθώς και ότι οι συγκεκριμένες δοκιμές απαιτούν μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να αποτραπεί τυχόν μόλυνση του εργαστήριου ή επιμολύνσεις αρνητικών δειγμάτων (119) και βέβαια το γεγονός ότι απαιτείται ακριβός εξοπλισμός (120).

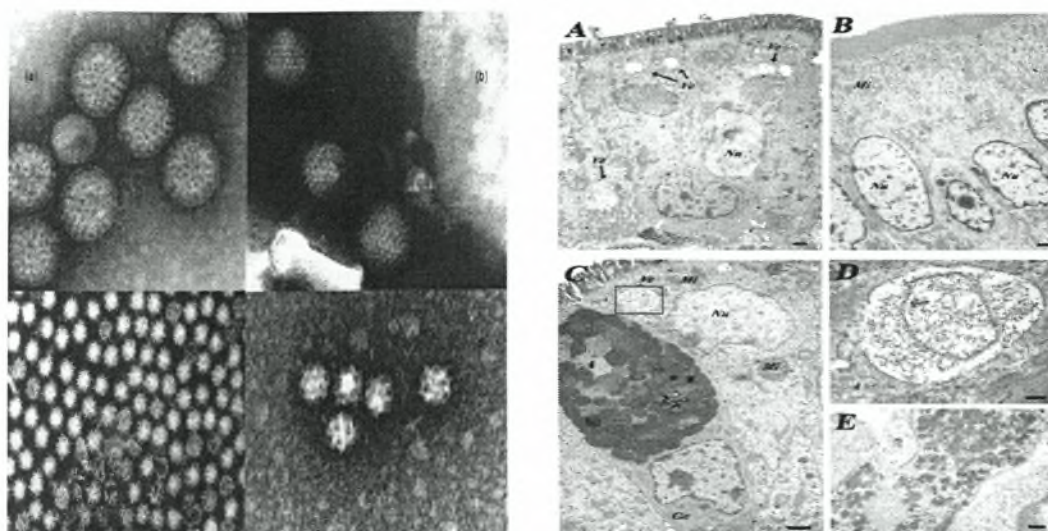
Κατά συνέπεια, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις πραγματοποίησης επιδημικών ερευνών. Έτσι, σε επιδημιολογικό επίπεδο, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός στελεχών, τα οποία είναι υπεύθυνα για διάφορα κρούσματα γαστρεντερίτιδας και ταυτόχρονα να αποκαλύψει τυχόν μεταλλάξεις των κυκλοφορούντων νοροϊκών στελεχών.

1.7.2 Διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς

Οι διαγνωστικές δοκιμές πρώτης γενιάς, που έχουν αναπτυχθεί για να ανιχνεύουν μολύνσεις από νοροϊούς, περιλαμβάνουν την ηλεκτρονική μικροσκοπία (άμεση), την ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (έμμεση) και την άνοση αιμοσυγκόλληση. Η επόμενη γενιά των δοκιμών περιλαμβάνει αυτές που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση των αντιγόνων των ιών του Νόργουικ, όπως ο ραδιοανοσοπροσδιορισμός (RIA) και οι ανοσολογικές αντιδράσεις. Τέλος η Western Blot αποτελεί μια ακόμη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αντίδρασης των αντισωμάτων σε μολυσμένα άτομα (119).

1.7.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Η τεχνική αυτή, αποτελεί μέθοδο για την ανίχνευση του ιού, καθώς βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του. Το όνομα Calicivirus προέρχεται από την μορφή που εμφανίζουν τα ιικά μόρια κατά την παρατήρηση με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (118). Ωστόσο, παρουσιάζονται ενίοτε εμπόδια όπως είναι η δυσκολία διαχωρισμού του ιού από άλλα σφαιρικά σωματίδια στα δείγματα που καθιστούν την μέθοδο μη αποδοτική και ακατάλληλη να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική εξέταση ρουτίνας.



Εικ.15. Δομή των Νοροϊών με ΗΜ (www.pubmed.gov PMID: 13679618).

1.7.4 Ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία

Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε για να προσδιορίσει τους ιούς caliciviruses ήταν η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία (118), με χρήση ορού που περιείχε τα κατάλληλα αντισώματα, έτσι ώστε να καταστεί εφικτή η ενίσχυση του ιού. Εντούτοις, η τεχνική είναι χρήσιμη μόνο για τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της μόλυνσης (πρώτες 24 – 48 ώρες) (118, 121).

1.7.5 Άνοση αιμοσυγκόλληση

Η δοκιμή αυτή, αποτελεί μια διαφοροποίηση της μελέτης της εξάπλωσης του ιού σε μεγάλους πληθυσμούς χρησιμοποιώντας καθαρά ιικά στελέχη του ιού, ως αντιγόνα (118).

1.7.6 Ανοσολογικές αντιδράσεις

Δεδομένου ότι οι βακουλοϊοί (baculoviruses) μπορούν να εκφράζουν τις καψιδικές πρωτεΐνες των νοροϊών, έχει επιτρέψει την ανίχνευση των ιών αυτών με ανοσο-ενζυμικές μεθόδους (ELISA). Η μέθοδος ELISA, πραγματοποιείται κάνοντας χρήση υπεράνοσου αντιορού και μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό σε σχετικά χαμηλά ποσοστά. Η έκφραση των ιικών αντιγόνων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί

ο τίτλος των αντισωμάτων (IgG) στο μολυσμένο δείγμα. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι ο περιορισμός των αντιγονικών τύπων που βρίσκονται μέχρι σήμερα στην διάθεση των διαγνωστικών εργαστηρίων (121).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

2.1.1 Θετικοί μάρτυρες

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών της διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα τα οποία στάλθηκαν από την Αγγλία, ως θετικοί μάρτυρες, από επιβεβαιωμένα περιστατικά προσβολής από νοροϊό, καθώς και ένα δείγμα το οποίο είχε απομονωθεί στο εργαστήριο σε προγενέστερη μελέτη (πίνακας 4).

Πίνακας 4

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ I (GI)	ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ II (GII)
GI 1	GII 1
GI 2	GII 2
GI 3	GII 3
	A6

2.1.2 Περιβαλλοντικά δείγματα

Τα περιβαλλοντικά δείγματα, λήφθηκαν από βιολογικούς καθαρισμούς του ελλαδικού χώρου. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν 11 δείγματα από τους βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Ιωαννίνων και των Τρικάλων, η κωδικοποίηση των οποίων παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5

Κωδικοποίηση δείγματος	Προέλευση δείγματος
LR6 F	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
LRB2 F	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
GNI F	Βιολογικός καθαρισμός Ιωαννίνων
LR2 F	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
TRI F	Βιολογικός καθαρισμός Τρικάλων
LR7 P	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
TR3 F	Βιολογικός καθαρισμός Τρικάλων
LR13 P	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
LR6 P	Βιολογικός καθαρισμός Λάρισας
TRI P	Βιολογικός καθαρισμός Τρικάλων
TR3 P	Βιολογικός καθαρισμός Τρικάλων

2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η επεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων έλαβε χώρα με δύο διαφορετικούς τρόπους, την μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων και την μέθοδο προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.

2.2.1 Μέθοδος διαχωρισμού δύο φάσεων

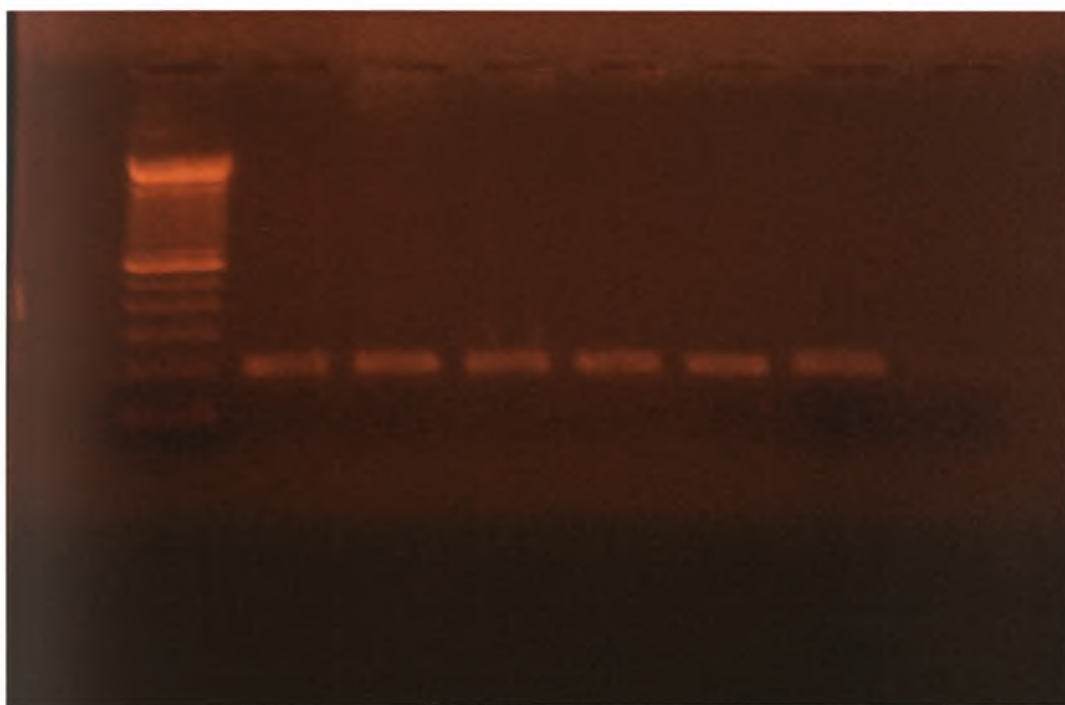
Αρχικά φυγοκεντρούνται 500 ml δείγματος στα 1000 rpm για 2 min. Το ίζημα φυλάσσεται στους 4°C, ενώ ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου στο 7 – 7,5. Σε 500ml υπερκείμενου (7 – 7,5 pH) προστίθενται 39,5 ml 22% (W/V) dextran, 287 ml 29% (W/V) PEG6000 και 35ml NaCl 5 N (Sigma, USA). Το μείγμα αναδεύεται για 1 h στους 4°C και στην συνέχεια εισάγεται σε φιάλη διαχωρισμού, όπου και παραμένει στους 4°C για 48 h. Η κάτω φάση, όπου και συγκεντρώνονται τα ικτά σωματίδια, συλλέγεται και προστίθεται χλωροφόρμιο 20% v/v και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 1500 g για 20 min. Η πάνω φάση συλλέγεται σε πλαστικό σωλήνα, όπου και προστίθενται πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη σε τελικές συγκεντρώσεις 100 units/ml και 100μg/ml αντίστοιχα (WHO 2003). Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG: Σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μείγμα αναδεύεται για 18h στους 4°C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιεργειών (MM).

2.2.2 Μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης από ηλεκτραρνητικά φίλτρα.

Δείγμα όγκου 500 ml φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 2 min. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ρυθμίζεται το pH στο 3,8 με την προσθήκη 3 N HCl. Στην συνέχεια, τα ικτά σωματίδια φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με την προσθήκη $MgCl^{2+}$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05 M. Ακολουθεί αργή ανάδευση και φιλτράρισμα σε ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF – Millipore), διαμέτρου 47mm και μέγεθος πόρου 3μm, στην επιφάνεια του οποίου προσροφούνται τα ικτά σωματίδια. Το φίλτρο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοχείο ζέσεως 250 ml, όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος 0,05 M Tris με pH 9, εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιείται με αργή ανάδευση για 10 min. Αφού απομακρυνθεί το

διάλυμα, η διαδικασία της έκλουσης επαναλαμβάνεται. Το φίλτρο φυλάσσεται στους 4°C, ενώ ρυθμίζεται το pH του συγκεντρωμένου δείγματος στο 7 με τη χρήση διαλύματος 3 N HCl. Ακολουθεί περαιτέρω συγκέντρωση του δείγματος με τη μέθοδο καθίζησης με PEG: Σε δείγμα όγκου 500 ml προστίθεται 10% W/V PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5 M. Το μείγμα αναδεύεται για 18h στους 4°C και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 11.000 rpm για 1h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα διαλύεται σε 5 ml θρεπτικού υλικού κυτταροκαλλιεργειών (MM).

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ RNA



Εικ.17. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά από εκχύλιση

Για την εκχύλιση του ιικού RNA από τα επεξεργασμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το QIAamp® Viral RNA Mini Kit της εταιρείας Qiagen (Germany), ακολουθώντας τα προτεινόμενα συνοδευτικά πρωτόκολλα του κατασκευαστή.

Για την επιβεβαίωση μη ύπαρξης αναστολέων και της σωστής εκχύλισης εφαρμόστηκε μία επιπλέον αντίδραση PCR. Στην αντίδραση αυτή, χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών που έχουν στόχο το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων, τα οποία συνυπάρχουν μέσα στο εκχυλισμένο δείγμα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι P11P και P13P (πίνακας 6) οι οποίοι αντιστοιχούν σε αλληλουχίες κοινές για όλα τα βακτήρια (εικ.17).

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

(Reverse Transcription – RT)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι νοροϊοί περιέχουν ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την μετατροπή του σε συμπληρωματικό cDNA, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR, η οποία θα καταστήσει εφικτή την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Έτσι, αρχικά ετοιμάζεται το μίγμα το οποίο περιέχει: τυχαίους εκκινητές (random primers) d(N9) (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (50nmol/μl, 1μl/tube), 10mM δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs, 1μl/tube, Invitrogen, UK) και απιονισμένο νερό (ddH₂O, Sigma, USA) ελεύθερο ριβονουκλεασών (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστίθεται 7μl/tube του μίγματος και 5μl του εκχυλισμένου ιικού RNA, ακολουθεί η φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorfs στους 65°C για 5min. Μετά την επώαση, τα eppendorfs τοποθετούνται στον πάγο και ετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M αντιοξειδωτικό διθειοθρεϊτόλη (DTT, 2μl/tube), αναστολέα ριβονουκλεασών (RNase out, 20units/μl, 0,5μl/tube), ddH₂O και η αντίστροφη μεταγραφάση (0,5μl) (Reverse Transcriptase) M-MLV (200units/μl, Invitrogen, UK). Προστίθεται ποσότητα (8μl/tube) από το δεύτερο μίγμα και ακολουθεί φυγοκέντρηση και επώαση αυτών σε τρεις διαδοχικές συνθήκες: 25°C, 37°C και 70°C για 15min.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

(Polymerase chain reaction – PCR)

2.5.1 Εκκινητικά μόρια

Στα συμπληρωματικά cDNA τμήματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της RT, εφαρμόζεται η αντίδραση PCR έτσι ώστε να ενισχυθούν. Τα εκκινητικά μόρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (πίνακας 6) και σχεδιάστηκαν και νέοι εκκινητές στο κλινικό δείγμα Α6 (πίνακας 7).

Πίνακας 6. Εκκινητικά μόρια από την υπάρχουσα βιβλιογραφία

PRIMER	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'-3'	Tm	ΘΕΣΗ GI	ΘΕΣΗ GII	PCR PRODUCT	
					GI	GII
P11P	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	63	1173-1192 16S rRNA	16S rRNA	217 bp	326 bp
P13P	AGGCCCGGGAACGTATTCAC	63	1370-1389 16S rRNA	4586-4605		
mon381	CCAGAATGTACAATGGTTATG C	49.1	5647-5668 Capsid	5362-5383	-	321 bp
mon383	CAAGAGACTGTGAAGACATC ATC	48	4163-4185 Capsid	5661-5683		
SRI-2	AAATGATGATGGCGTCTA	42.8	5356-5373 Capsid	3-20	315 bp	

SRI-1	CCAACCCARCCATTRTACAT	-	5652-5671 Capsid	5467- 5486		
SRI-3 (seminested)	AAAAYRTCACCGGGKGTAT	54	5578-5596 capsid	5653- 5681	SRI-2, SRI-3 snPCR 240 bp	
SRII-2	TWCTCYTTYTATGGTGATGAT GA	58	4856-4878 3Dpol	4583- 4605		513 bp
SRII-1	CGCCATCTTCATTACAAA	53	5351-5369 3Dpol	5078- 5096		
SRII-3 (seminested)	TTWCCAAACCAACCWGCTG	55	3179-3197 3Dpol	4767- 4785		SRII-2, SRII-3 (snPCR) 202 bp
P290	GATTACTCCAAGTGGGACTCC AC	65	4568-4589 3Dpol	4295- 4317	316 bp	318 bp
P289	TGACAATGTAATCATCACCAT A	55	4865-4884 3Dpol	4592- 4613		
P11P	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	63	1173-1192 16S rRNA	16S rRNA	217 bp	
P13P	AGGCCCGGGAACGTATTAC	63	1370-1389 16S rRNA			
Calman-1	GCACACTGTGTTACACTTCC	58	4840-4858 3Dpol	4194- 4212		

Calman-2	ACATTGGCTCTTGTCTGG	54	3668-3683 3Dpol	4998- 5016		822 bp
Calman-29	TATGGTGATGATGAAATAGT GTC	58	4865-4887 3Dpol	4592- 4611	487 bp	
Calman-32	ATTTCGGGCAGAAGATTG	52	5335-5352 3Dpol	6863- 6880		
P78	GGGCCCCCTGGTATAGGTAA	54.3	1682-1701 2C helicase	2511- 2530	288 bp	-
P80	TGGTGATGACTATAGCATCAG ACACAAA	57.9	1943-1970 2C helicase	1748- 1775		
GV6	TTTATCAATTNAAGCCTG	-	6886-6903 ORF 3	5527- 5544	222 bp	GV5, GV7 185 bp
GV5	TNTAATGGCTGGAGCTTT	-	1603-1620 ORF 3	6700- 6717		
GV7	NATCATCTCNTTNTCATG	-	7091-7108 ORF 3	6868- 6885		
G1F1	CTGCCCCGAATTYGTAATGAT	56.0	5342-5362 CAPSID	7475- 7492	329 bp	
G1R1	CCAACCCARCCATTRTACATT T	58.0	5650-5671 CAPSID	5366- 5386		

G2F1	GTGGGAGGGCGATCGCAATC T	65.0	5320-5340 CAPSID	5047- 5067	272 bp	
G2R1	TGCATAACCATTRTACATTCT	53.0	2931-2951 CAPSID	1404- 1423		
G1SKF	CTGCCCCGAATTYGTAATGA	55.0	5342-5361 CAPSID	7474- 7492	329 bp	
G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	55.0	5653-5671 CAPSID	5368- 5386		
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	63.0	5321-5337 CAPSID	5046- 5064	350 bp	343 bp
G2SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTAC AT	64.0	5652-5671 CAPSID	5367- 5389		
MR3 nested 1 st	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	57.0	4485-4503 POL	4212- 4230	468 bp	468 bp
MR4 nested 1 st	AGTGGGTTTGAGGCCGTA	56.0	4937-4953 POL	4664- 4680		
YURI22F nested 2 nd	ATGAATGAGGATGGACCCAT	56.0	4991-5010 POL	4232- 4251		372 bp
YURI22R nested 2 nd	CATCATCCCCGTAGAAAGAT	56.0	4858-4977 POL	4585- 4604		

Πίνακας 7. Εκκινητικά μόρια τα οποία σχεδιάστηκαν με βάση το κλινικό δείγμα Α6

PRIMER	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'-3'	Tm	PCR PRODUCT GII
NVL R 52	GTC CAA GCC CAC TCC TGT T	59.0	820
NLVR 871	AGA CGG TAA ACT CGC CCT GT	60.0	
NLV R 58	GCC CAC TCC TGT TTT TCA TT	56.0	699
NLV R 756	TGC CAT AAC CTC ATT GTT GG	56.0	
NLV R 166	ACC CGA CCT GAC AAA ATG A	55.0	876
NLV ORF 1041	GGC AAA AAC ACT GGC TCA AG	58.0	
NLV ORF 126	GGA TGG GGA GTG TGA AAG G	59.0	1097
NLV R 166	ACC CGA CCT GAC AAA ATG A	55.0	
NLV ORF 1955	CAG GAA TGG GTT CAG CAC TT	58.0	948
NLV ORF 2902	CTT TGG GGA CGG TTG AGA C	59.0	
NLV ORF 2029	TCC TGA CAC TGG GAG AAA CA	58.0	874
NLV ORF 2902	CTT TGG GGA CGG TTG AGA C	59.0	

NLV ORF 941	GTT CCA CCA CAT TTC CCT GT	58.0	988
NLV ORF 1928	ACC CAT AAC CAC CAG CAG AT	58.0	
NLV ORF 769	TTC ACC AAG GAA CTC ACC TG	58.0	985
NLV ORF 1753	GGG CTG TCC ATC ATC AAA AT	56.0	
NLV ORF 1290	GAT TCC CCG CTC CAA TAG AC	60.0	685
NLV ORF 1974	AAG TGC TGA ACC CAT TCC TG	58.0	
NLV ORF 2029	TCC TGA CAC TGG GAG AAA CA	58.0	675
NLV ORF 2703	CGT TGA ATG GGT TGA TTG TG	56.0	
NLV ORF 1252	ACT CCC CAT CCT GAC TCT TG	60.0	723
NLV ORF 1974	AAG TGC TGA ACC CAT TCC TG	58.0	
NLV H 144	TGA CCA AGA TAC AGG AAG ATT GC	61.0	758
NLV H 901	TCA AGT GCC ATA ACC TCA TTG T	58.0	
NLV H 297	AAG CCC ACT CCT GTT TTT CA	56.0	600
NLV H 896	TGC CAT AAC CTC ATT GTT GG	56.0	
NLV C 463	CTT CTG CCC CTC CCT GAT A	59.0	968

NLV C1430	GGT GCT GCT TCC TGG TAA AA	58.0	
NLV C 560	GGG CTA ACT CTG GTG AGG AT	60.0	963
NLV C 1522	TGA GGA ACC CTT CTC TGT GC	60.0	
NLV C 775	CAA CCC CAA AAT GGT AGG TG	58.0	715
NLV C 1489	AGA TGT TAC GCC CAG TAT CG	58.0	
NLV C 615	CGC CCC AGA TTT TGA GTT C	57.0	762
NLV C 1376	ATG TAG CCA GAC CCG TAG CC	63.0	

Σε όλες τις αντιδράσεις PCR το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης ήταν το ίδιο:

- cDNA (3μl)
- dNTPs 10mM, Invitrogen, UK, (5μl)
- Taq reaction buffer 10x, (5μl)
- Taq DNA πολυμεράση (5u/μl, Paq5000, Strategene, USA), (0,5μl)
- Primers (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), (2μl) και ddH₂O (nuclease free), (μέχρι τελικό όγκο 50μl)

σε ορισμένες αντιδράσεις προστέθηκε επιπλέον MgCl₂ (50mM) ως συνπαράγοντας, έτσι ώστε να ενισχυθεί η ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης.

Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου στόχου, στους 95°C για 2min και ακολουθεί η εφαρμογή των διαφορετικών, για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης. Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων προϊόντων PCR.

Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης, εφαρμόστηκαν δύο επιπλέον αντιδράσεις, η Autonested και η Semಿನested PCR. Και στις δύο περιπτώσεις, εφαρμόζεται μια απλή PCR για 25 κύκλους και στην συνέχεια το προϊόν αυτής υποβάλλεται, κατόπιν αραίωσης, σε μια δεύτερη PCR. Στην πρώτη περίπτωση με τους ίδιους αρχικούς εκκινητές, ενώ στην δεύτερη περίπτωση με ένα ζεύγος εκκινητών όπου ο ένας είναι ο πρώτος εκκινητής της PCR και ο δεύτερος είναι εσωτερικός.

2.5.2 Συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται, οι συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας, στην παρούσα διατριβή (πίνακας 8).

Πίνακας 8

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες PCR	Κύκλοι	Συνθήκες Autonested PCR και Semಿನested PCR	Κύκλοι
JV12Y - JV13I	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 37°C για 1 min Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
SRII-1 SRII-2 SRII-3	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (SRII-2 - SRII-3)	40 κύκλοι
P78 – R80	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι

G2SKR – G2SKF	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
CALMAN 1 – 2	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50 °C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
CALMAN 29 – 32	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50 °C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
MR3 – MR4 YURI22F – YURI22R	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55 °C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (YURI22F – YURI22R)	40 κύκλοι
P289 – P290	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 43°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
MON 381 – 383	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 43°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
SRI-2 SRI-1 SRI-3 (seminested)	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 40 °C για 30sec Επιμήκυνση: 72 °C για 30sec (SRI-2 SRI-1)	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (SRI-2 SRI-3)	40 κύκλοι
NLVORF 2029 – 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι

NLVORF 941 - 1928	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 53°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 2029 - 2703	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 58 – 756	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 463 – 1430	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVH 297 – 896	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 166 – NLVORF 1262	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 166 – NLVORF 1041	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVR 52 – 871	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι

NLVORF 1955 – 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 769 – 1753	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 52°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 1290 – 1974	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVORF 1252 - 1974	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 560 – 1522	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 775 – 1489	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVC 615 – 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι
NLVH 144 – 901	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Ομοίως με PCR	40 κύκλοι

NLVR 166 – NLVORF 1262 & NLVR 166 –1041	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVR 166 – NLVORF 1041)	40 κύκλοι
NLVR 52 – NLVORF 871 & NLVR 58 – 756	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 50°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVR 58 – 756)	40 κύκλοι
NLVORF 1955 –2902 & NLVORF 2029 – 2902	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVORF 2029 – 2902)	40 κύκλοι
NLVC 463 – 1430 & NLVC 615 – 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVC 615 – 1376)	40 κύκλοι
NLVC 560 – 1522 & NLVC 615 – 1376	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVC 615 – 1376)	40 κύκλοι
NLVH 144 – 901 & NLVH 297 – 896	Αποδιάταξη: 95°C για 30sec Υβριδοποίηση: 55°C για 30sec Επιμήκυνση: 72°C για 30sec	25 κύκλοι	Seminested PCR Ομοίως με PCR (NLVH 297 – 896)	40 κύκλοι

2.6 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.6.1 Καθαρισμός των προϊόντων

Τα θετικά προϊόντα της κάθε autonested ή seminested PCR, ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ο προσδιορισμός του μήκους των επιθυμητών προϊόντων πραγματοποιείται με χρήση μάρτυρα μοριακού βάρους, 100bp DNA Ladder, ο οποίος εμφανίζει το μοριακό βάρος της κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Οι αντίστοιχες ζώνες στα προϊόντα των autonested ή seminested PCR, απομονώνονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένα tubes των 2 ml. Ακολουθεί καθαρισμός των προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, Germany), εφαρμόζοντας το εσωκλειστο, συνιστώμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.6.2 Autonested GoTaq PCR

Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων από το πήκτωμα αγαρόζης, εφαρμόζεται η αντίδραση GoTaq PCR. Σκοπός της εφαρμογής αυτής, είναι η εκθετική ενίσχυση των συγκεκριμένων περιοχών, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2min, ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης στους 95°C για 1min, υβριδοποίησης για 30sec, η θερμοκρασία της οποίας εξαρτάται κάθε φορά από το ζεύγος των εκκινητών και επιμήκυνσης στους 72°C για 1min, για 20 κύκλους. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει την επώαση των δειγμάτων για 5min στους 72°C. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση αυτών σε 2% συγκέντρωση αγαρόζης και ο δεύτερος καθαρισμός τους από το πήκτωμα, με χρήση του προαναφερθέντος kit.

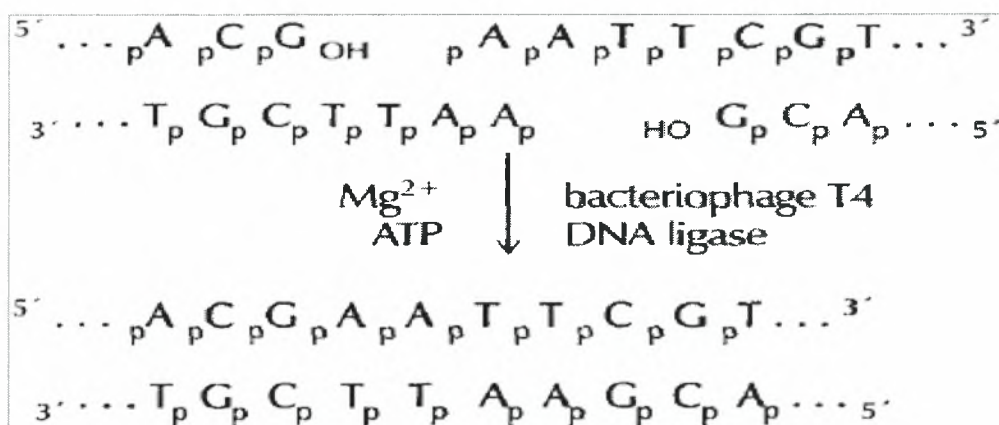
2.6.3 Μοριακή κλωνοποίηση των προϊόντων

Η διαδικασία, έλαβε χώρα καθώς υπήρχε η υποψία για ταυτόχρονη ύπαρξη των πάνω του ενός στελέχους νοροϊών σε αυτά. Έτσι, κάθε κλώνος μετασχηματισμένων

βακτηριακών κυττάρων που προέκυψε, περιείχε κλωνοποιημένο το γενωμικό τμήμα από μόνο ένα διακριτό στέλεχος. Για την πραγματοποίηση της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων της autonested GoTaq PCR καθώς και την οπτική επιβεβαίωση της διαδικασίας, ακολουθήθηκαν τέσσερα διαδοχικά βήματα.

A. Αντίδραση λιγάσης

Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να επιτραπεί η ενσωμάτωση του ενισχυμένου, πλέον, γενωμικού τμήματος σε πλασμίδιο (φορέα κλωνοποίησης). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ο pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, USA).



Εικ.18. Αντίδραση λιγάσης

Ο φορέας αυτός, περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker), η οποία περιέχει μία θέση ενσωμάτωσης με μονόκλωνες ουρές poly(T). Τα προϊόντα της PCR, μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης autonested GoTaq PCR, απέκτησαν στα άκρα τους poly(A) μονόκλωνες ουρές (συμπληρωματικά άκρα). Το γεγονός αυτό, επέτρεψε στην T4 DNA λιγάση του βακτηριοφάγου, να πραγματοποιήσει την σύνδεση τους. Η συμπληρωματικότητα αυτών των άκρων, επέτρεψε στα δύο δίκλινα μόρια DNA να ενωθούν μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών που δημιουργεί η λιγάση ανάμεσα στο 3' υδροξύλιο και την διπλανή 5' φωσφορική ομάδα του DNA, οδηγώντας τελικά στην ένθεση του προϊόντος της PCR (εικ. 18).

Η πειραματική διαδικασία της αντίδρασης της λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μίγμα περιείχε pGEM®-T Easy Vector 50ng, προϊόν autonested GoTaq PCR, T4 DNA Ligase (3u/μl) και 2x Rapid Ligation Buffer.

B. Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με χημική μέθοδο (χλωριούχο ασβέστιο - CaCl₂)

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5. Το στέλεχος αυτό δεν είναι ικανό να προκαλέσει ανασυνδυασμούς και κατασταλτικές μεταλλάξεις amber. Επίσης, η φ80 lacZ ΔM15 μετάλλαξη στην αλληλουχία του γενωμάτος του, επιτρέπει α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (τμήμα α) που κωδικοποιείται από τον φορέα κλωνοποίησης. Το τμήμα Ω της β-γαλακτοσιδάσης κωδικοποιείται από το βακτηριακό γένωμα. Τέλος, για τον σχηματισμό ενεργού ενζύμου, απαιτείται και το τμήμα α, το οποίο κωδικοποιείται από τον φορέα, εσωτερικά του οποίου υπάρχει η περιοχή πολυσυνδέτη, που η παρουσία της δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο.

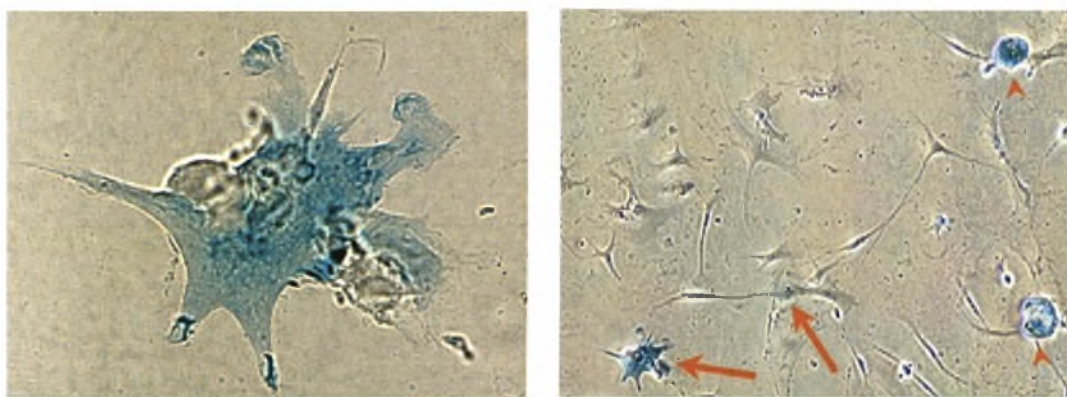
Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την συλλογή βακτηριακών κυττάρων, τα οποία είναι αποθηκευμένα στους -80°C και τη μεταφορά τους στο αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth (20g/L, Sigma, USA). Ακολουθεί η επώαση τους για 16h (overnight) στους 37°C στις 210 στροφές/λεπτό και στην συνέχεια μετρίεται η απορρόφηση τους σε OD₆₀₀, έτσι ώστε να διακοπεί η κυτταρική ανάπτυξη (τοποθέτηση σε πάγο) όταν τα κύτταρα φτάσουν στην εκθετική φάση της ανάπτυξης τους (0,450-0,550A). Στην συνέχεια, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 10min στους 4°C και απορρίπτεται το υπερκείμενο, διαλυτοποιείται το ίζημα σε παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M (Sigma, USA), η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.

Γ. Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, ξεκινά με τη μεταφορά αυτών σε αποστειρωμένα tubes. Ακολουθεί η προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης της λιγάσης, του κάθε δείγματος, σε αντίστοιχο tube και μετά από ήπια ανάδευση, τοποθετούνται στον πάγο για 30min. Στην συνέχεια, επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90sec και

ακολουθώντας μεταφέρονται και πάλι στον πάγο για 2min (heat shock). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας heat shock, μεταφέρεται ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων σε falcon με LB Broth και επωάζονται στους 37°C στις 180 στροφές/λεπτό για 1h, ο σκοπός αυτής της επώασης είναι η «επούλωση» της πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος, επιστρέφεται ποσότητα από την κάθε καλλιέργεια σε τριβλίο, το οποίο περιέχει LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη (6,6mg/ml) και κατόπιν προστίθεται ποσότητα της οργανικής ενώσεως X-gal (50mg/ml, Promega, USA). Τα τριβλία επωάζονται για 16h στους 37°C.

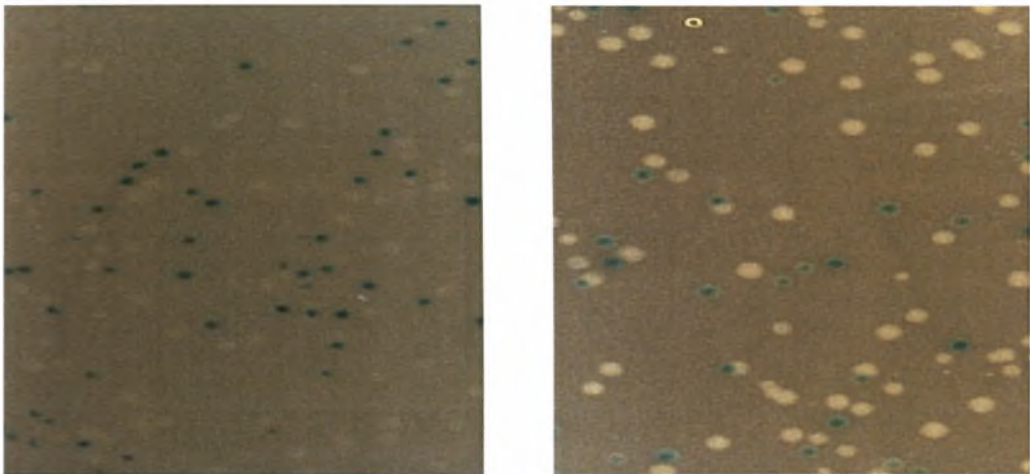
Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβαίνει στη σύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, έτσι, αποτρέπεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας, πέραν όσων έχουν μετασχηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την ουσία X-gal, η διάσπαση της από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος (εικ. 19).



Εικ.19 Η διάσπαση της ουσίας X-gal από την β-γαλακτοσιδάση

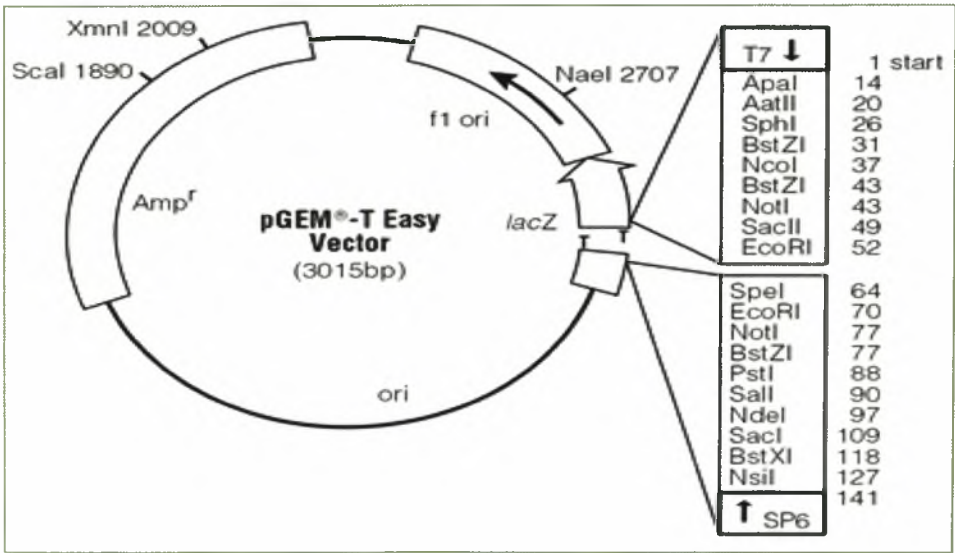
Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, παράγεται το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης, σχηματίζοντας το ενεργό ένζυμο και η X-gal διασπάται παράγοντας μπλε αποικίες. Στην περίπτωση που έχει γίνει ένθεση του προϊόντος PCR στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος α της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται, με αποτέλεσμα να μην παραχθεί το ενεργό ένζυμο και οι αποικίες να εμφανίζονται λευκές.

Η πειραματική διαδικασία συνεχίζει με την συλλογή των λευκών αποικιών, την εισαγωγή τους στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB Broth, το οποίο περιέχει αμπικιλίνη και ακολουθεί η επώαση τους για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Ακολουθεί η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με το συνοδευτικό προτεινόμενο πρωτόκολλο του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας από τις λευκές αποικίες (εικ. 20).



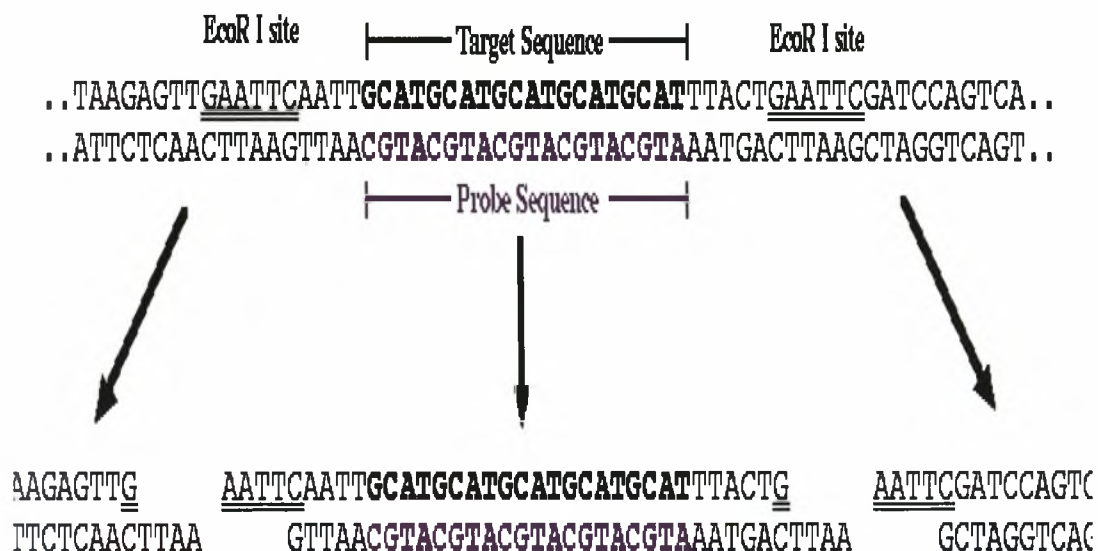
Εικ. 20. Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης (www.bio.davidson.edu)

Δ. Πέψη με EcoRI



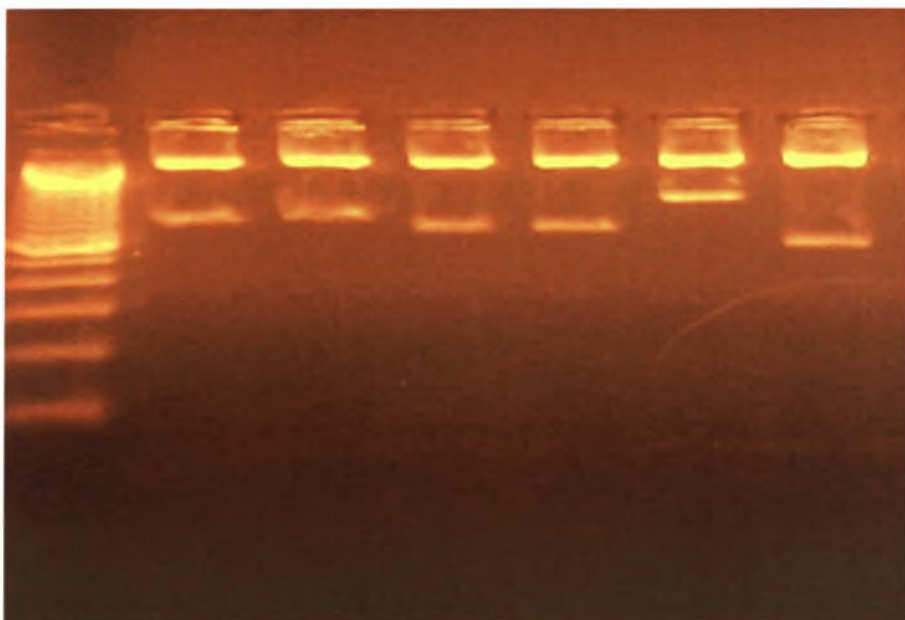
Εικόνα 21: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής της EcoRI.

Η πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης είναι σημαντική για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στον πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης. Η πέψη γίνεται με το ένζυμο περιορισμού EcoRI (Restriction Enzyme EcoRI, Takara Biomedical group, Shiga, Japan), του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη (εικ. 22).



Εικ. 22. Θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου EcoRI στον πλασμιδιακό φορέα (www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/RFLP.html.)

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 10x H Buffer, ένζυμο EcoRI και ddH₂O. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Η ποσότητα που προκύπτει ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. (εικ. 23)



Εικ. 23 Ενδεικτική εικόνα πέψης με EcoRI

2.6.4 Εύρεση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των κλωνοποιημένων προϊόντων (αλληλούχιση)

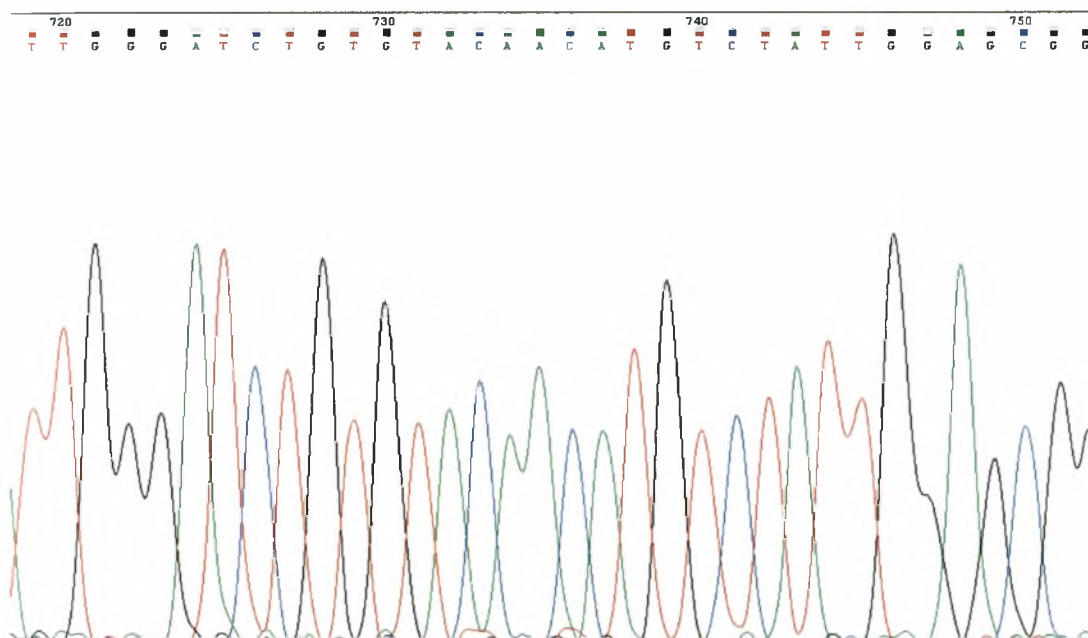
Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων προϊόντων της autonested GoTaq PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen Inc. (Seoul, Korea), με εκκινητές τους προαγωγείς T7 και SP6 του φορέα κλωνοποίησης, οι οποίοι βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης

2.6.5 Επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κλωνοποιήθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και εξελικτική τους σχέση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων και κλινικών στελεχών των νοροϊών, οι οποίες βρίσκονται καταχωρημένες στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα δεδομένων (GenBank).

Η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών αυτών πραγματοποιήθηκε με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται δωρεάν στο διαδίκτυο.

2.6.6 Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών



Εικ. 24. Οι «κορυφές» του χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις διαφορετικές βάσεις της αλληλουχίας του DNA.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος (εικ. 24) πριν την επεξεργασία του οποίου, απαιτείται ο έλεγχος και η διόρθωση πιθανών λαθών. Τέτοια λάθη μπορεί να αποτελούν πιθανά κενά στην αλληλουχία, δηλαδή κορυφές του χρωματογραφήματος που δεν έχουν διαβαστεί και υπολείπονται από το κείμενο που αντιστοιχεί στην πρωτοδιάταξη της αλληλουχίας, καθώς και κάποιες κορυφές να αναγνωρίζονται ως N, δηλαδή ως πιθανή ύπαρξη στην συγκεκριμένη θέση, οποιασδήποτε από της A, T, G ή C βάσης. Στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ασφαλής διόρθωση κάποιας αλληλουχίας, ζητείται η επανάληψη της αλληλούχησης (resequencing).

2.6.7 Αναζήτηση ομόλογης αλληλουχίας

Η αναζήτηση της κοντινότερης ή όμοιας αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο. Ο

αλγόριθμος BLAST, αναζητά κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, στη GenBank, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται σε μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός, παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης κατά συνέπεια και ομολογίας.

2.6.8 Ομοπαράθεση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών

Το πρώτο βήμα στην ανάλυση των αλληλουχιών και την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων είναι η στοίχιση των υπό μελέτη γενωμικών τμημάτων. Στη παρούσα εργασία η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το ClustalW χρησιμοποιήθηκαν για την φυλογενετική μελέτη, η οποία απαιτεί τοπολογική ομολογία. Αυτό σημαίνει, ότι τα νουκλεοτίδια που παρατηρούνται σε μία συγκεκριμένη θέση στις διάφορες ταξινομικές βαθμίδες «κατάγονται» από μία συγκεκριμένη θέση ενός κοινού προγόνου. Όταν λοιπόν, δύο ή περισσότερες, υποθετικά ομόλογες αλληλουχίες έχουν διαφορετικό μήκος, τότε η τοποθέτηση των κενών επιτρέπει την ανάκτηση αυτής της τοπολογικής ομολογίας.

Επίσης, με το πρόγραμμα ClustalW πραγματοποιήθηκαν οι στοιχίσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των νοροϊικών στελεχών των περιβαλλοντικών μη επεξεργασμένων δειγμάτων που μελετήθηκαν, με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών με τα οποία εμφανίζουν την υψηλότερη ομοιότητα αλληλουχίας το καθένα, καθώς επίσης και με των προτύπων στελεχών Norwalk (AF093797.1) όταν αναμένεται το στέλεχος να ανήκει στην γενετική ομάδα GI και Lordsdale (X86557.1) όταν αναμένεται να ανήκει στην γενετική ομάδα GII.

Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Gene Runner V. 3.05 για την ανάκτηση των αμινοξικών αλληλουχιών από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των στελεχών των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

2.6.9 Κατασκευή φυλογενετικών δένδρων

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έλαβε χώρα με τη μέθοδο Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining - NJ) χρησιμοποιώντας την παράμετρο p-distance. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων ήταν το MEGA 4.

Η μέθοδος Neighbor Joining είναι μία μέθοδος πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών με ταυτόχρονη μετατροπή της διαφοροποίησης αυτών, όπως για παράδειγμα του ποσοστού των καταλοίπων που διαφέρουν μεταξύ των δύο αλληλουχιών, σε εξελικτική απόσταση. Η στοίχιση πραγματοποιείται προοδευτικά (Progressive Alignment). Αρχικά στοιχίζονται οι δύο πιο συγγενικές αλληλουχίες, ενώ εν συνεχεία, για την προσθήκη των επόμενων αλληλουχιών, οι δύο πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία. Μετά τη στοίχιση της επόμενης συγγενικής αλληλουχίας, οι τρεις πρώτες αλληλουχίες αντιμετωπίζονται ως μία και ούτω καθεξής. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου NJ είναι ότι δεν χρησιμοποιεί κάποιο υποθετικό μοριακό ρολόι, με αποτέλεσμα να αποδίδει πιο σωστά την φυλογένεση, όταν διαφορετικές γενιές (lineages) παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τον εξελικτικό τους ρυθμό.

Τέλος, η παράμετρος p-distance ή observed distance (παρατηρούμενη απόσταση), εκφράζει την αναλογία των διαφορετικών ομόλογων θέσεων μεταξύ των διαφορετικών αλληλουχιών και εκφράζεται ως ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών ανά θέση. Στηρίζεται στη βασική αρχή της απλούστερης προσέγγισης για τον υπολογισμό της απόκλισης μεταξύ δύο κλώνων στοιχισμένων DNA αλληλουχιών, η οποία είναι η μέτρηση των θέσεων όπου αυτοί διαφέρουν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR, AUTONESTED ΚΑΙ SEMINESTED

Από τα 10 περιβαλλοντικά και 7 θετικά κλινικά δείγματα τα οποία εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, κανένα δεν ενισχύθηκε με όλα τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο, τρία από τα περιβαλλοντικά δείγματα ενισχύθηκαν με τουλάχιστον ένα ζεύγος των εκκινητικών μορίων στην αντίστοιχη γενωμική περιοχή (πίνακας 9), ενώ ένα από τα κλινικά δείγματα (Α6) ενισχύθηκε με 13 ζεύγη εκκινητών (πίνακας 10).

Πίνακας 9

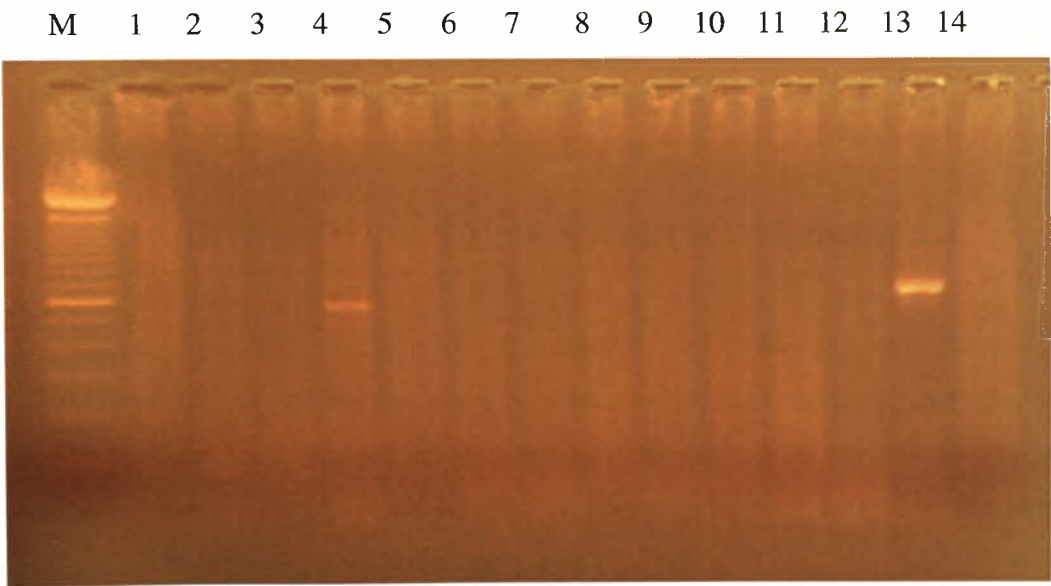
Περιβαλλοντικά Δείγματα	PRIMERS	ΘΕΣΗ GI	ΘΕΣΗ GII	PCR PRODUCT GI GII	
LR6F	NLV ORF 1290 - NLV ORF 1974	—	5796 – 6482 ORF2	-	685 bp
GNIF	P78 – P80	1682-1701 & 1943-1970 2C helicase	2511-2530 & 1748-1775	288 bp	-
TR3F	mon381 – mon383	5647-5668 & 4163-4185 Capsid	5362-5383 & 5661-5683	-	321 bp

Πίνακας 10

Κλινικό δείγμα	PRIMERS	ΘΕΣΗ GII	PCR PRODUCT GII
A6	NLV ORF 2029 - NLVORF 2902	6565 – 7420 ORF2 & ORF3	874 bp
	NLVR 58 – NLVR 756	4460 – 5162 ORF1	699 bp
	NLVC463 – NLVC1430	5571 – 6455 ORF2	933 bp
	NLVORF941 – NLVORF1928	5535 – 6415 ORF2	988 bp
	NLVR52 – NLVORF871 & NLVR 58 – NLVR 756	4564 – 5287 ORF1	699 bp
	NLVORF2029 – NLVORF2703	6546 – 7227 ORF2 & ORF3	675 bp
	NLVORF1955 – NLVORF2902 & NLV ORF 2029 - NLVORF 2902	6512 – 7441 ORF2 & ORF3	874 bp
	NLVH297 – NLVH896	4891 – 5492 ORF1 & ORF2	600 bp

	NLVORF1955 – NLVORF2902	6605 – 7421 ORF2 & ORF3	948 bp
	SRII-1 - SRII-2 - SRII-3 (seminested)	4583-4787 ORF1	204 bp
	G2SKF – G2SKR	5040 – 5340 ORF2	300 bp
	MON381 – MON383	5361 – 5574 ORF2	213 bp

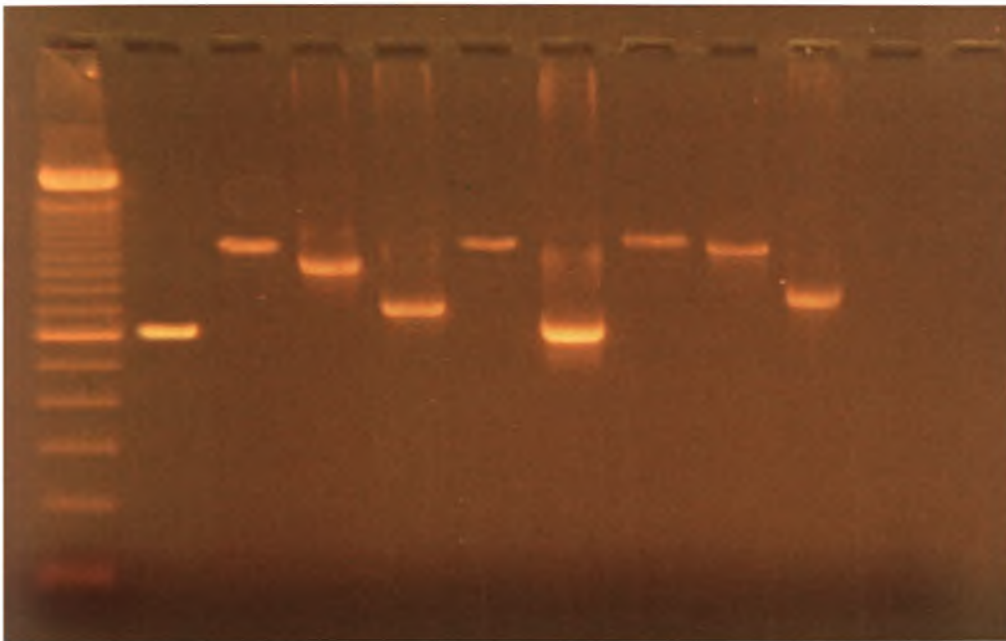
Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται, ενδεικτικά, το θετικό αποτέλεσμα του κλινικού δείγματος Α6 που προέκυψε μετά την εφαρμογή της autonested PCR με το ζεύγος εκκινητών NLV58 – NLVR756 (εικ. 25)



Εικ. 25 M: μάρτυρας μοριακού βάρους, 1 έως 6: άγνωστα περιβαλλοντικά δείγματα, 7: αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O), 8 έως 12 άγνωστα περιβαλλοντικά δείγματα, 13: Α6 θετικό κλινικό δείγμα (699bp), 14: αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ AUTONESTED GoTaq PCR

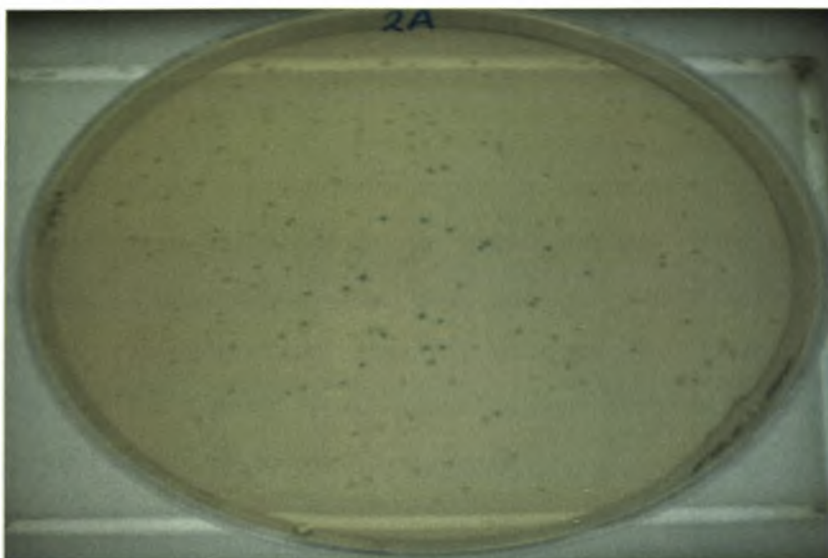
Η αντίδραση autonested GoTaq PCR ήταν θετική σε όλα τα δείγματα όπου εφαρμόστηκε, αφού ενισχύθηκε η ένταση της ζώνης στο πήκτωμα αγαρόζης, γεγονός που αποδεικνύει την αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της autonested και seminested PCR, αντίστοιχα. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται μία εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων της autonested GoTaq PCR (εικ. 26).



Εικ. 26 Ηλεκτροφόρηση θετικών δειγμάτων μετά την εφαρμογή της GoTaq PCR.

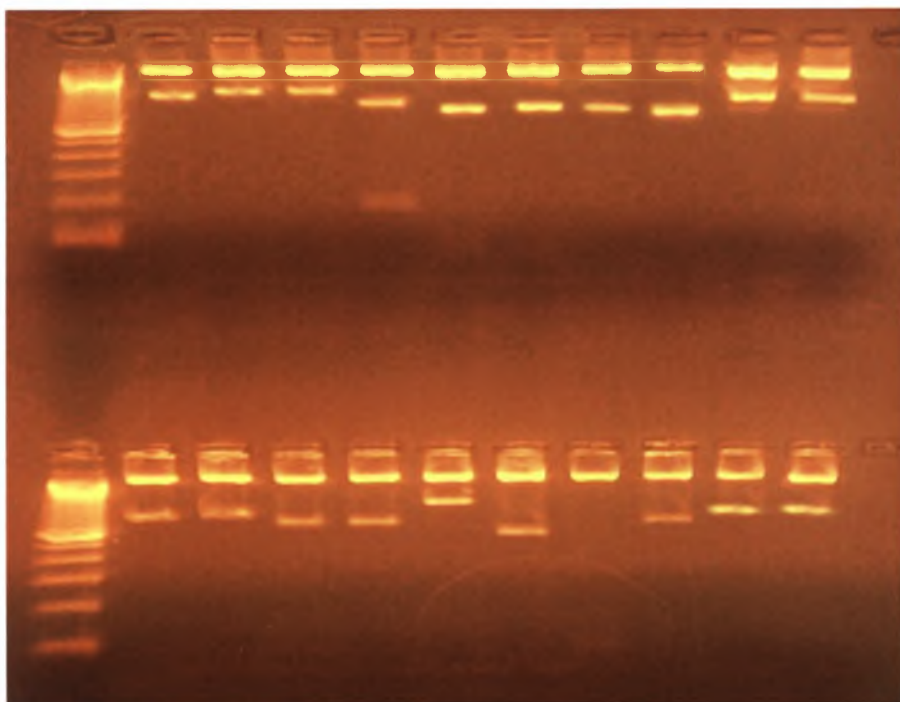
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μοριακή κλωνοποίηση των δειγμάτων, περιλαμβάνει αρκετά στάδια έως ότου να γίνει εφικτός ο έλεγχος της επιτυχίας της αντίδρασης. Έτσι, ένας πρώτος έλεγχος πραγματοποιείται μετά την επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο που περιέχει την ουσία X-gal, με την παραγωγή λευκών αποικιών (εικ.27).



Εικ. 27. Διάκριση μεταξύ μπλε και λευκών αποικιών για τον εντοπισμό ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης.

Ο δεύτερος έλεγχος, πραγματοποιείται με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Σκοπός της αντίδρασης αυτής, είναι η επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης ολόκληρης της αλληλουχίας του επιθυμητού προϊόντος της PCR, στη θέση ενσωμάτωσης του φορέα κλωνοποίησης (εικ. 28).



Εικ. 28. Ενδεικτική απεικόνιση πέψης με EcoRI

3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

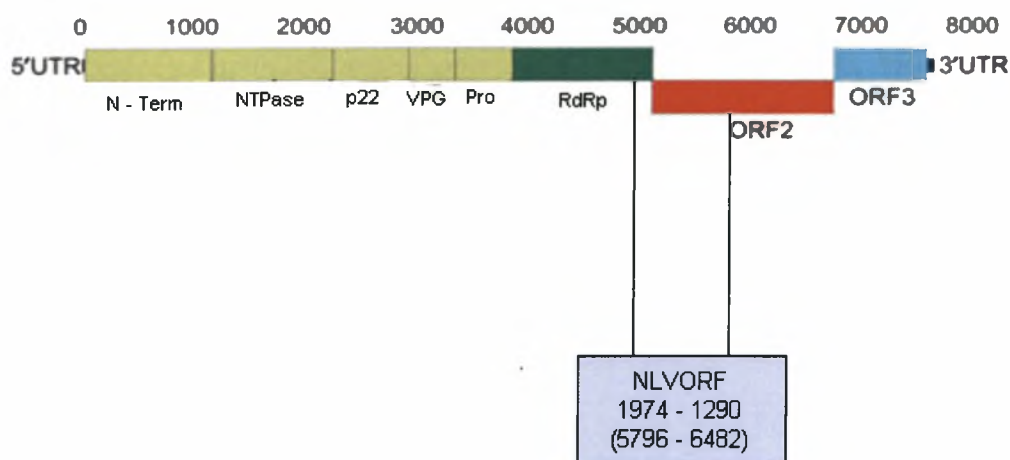
Μετά τη λήψη των χρωματογραφημάτων, την επεξεργασία και την αναζήτηση της κάθε ομόλογης αλληλουχίας, με την βοήθεια των προγραμμάτων βιοπληροφορικής, διαπιστώθηκε ότι, τρία από τα περιβαλλοντικά δείγματα αντιπροσώπευαν ένα διαφορετικό νοροϊκό στέλεχος. Το κλινικό δείγμα A6 αλληλουχίστηκε σε μια περιοχή η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του ORF1 και ολόκληρο το ORF2 μέχρι και το ενδιάμεσο του ORF 3.

3.5 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων έχει ως σκοπό την ταξινόμηση του κάθε στελέχους, που εντοπίστηκε, σε επίπεδο γενετικής ομάδας. Έτσι, κάθε περιβαλλοντικό στέλεχος συγκρίθηκε με τα στελέχη όπου, με βάση το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BLAST, εμφάνιζε μεγαλύτερη ομοιότητα καθώς και τις γενετικές ομάδες GI και GII, οι υποομάδες των οποίων, αποτελούν σημαντικά παθογόνα για τον άνθρωπο.

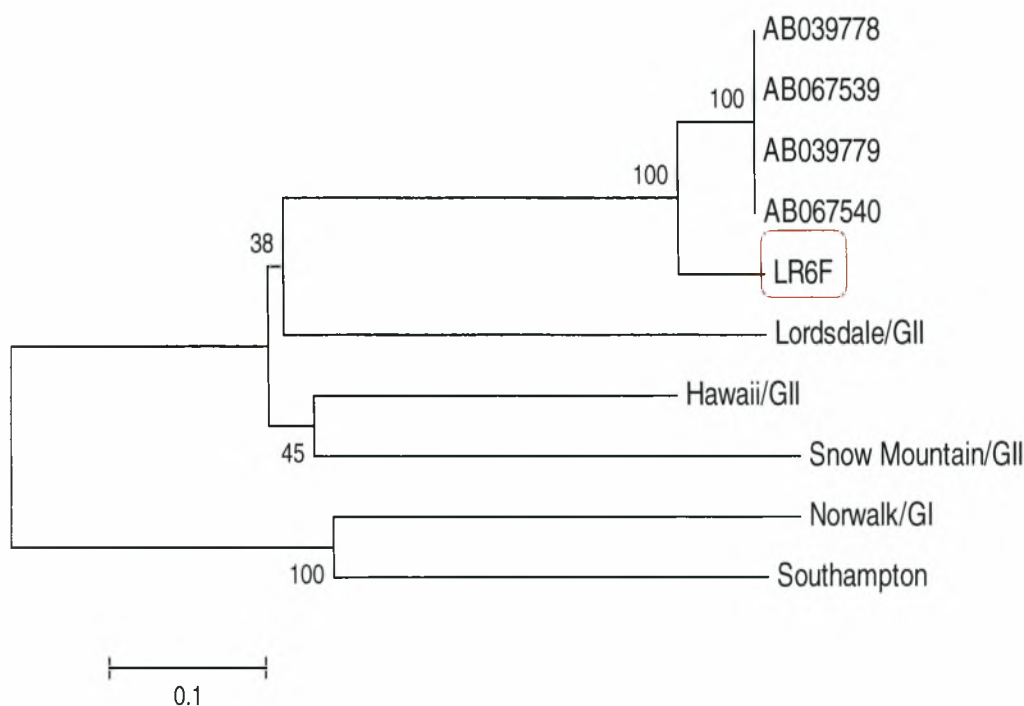
Περιβαλλοντικά στελέχη

LR6F



Σχήμα 1. Απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης των εκκινητών NLVORF 1974 – 1290 που εντοπίσαν το περιβαλλοντικό δείγμα LR6F, στο γένωμα του ιού.

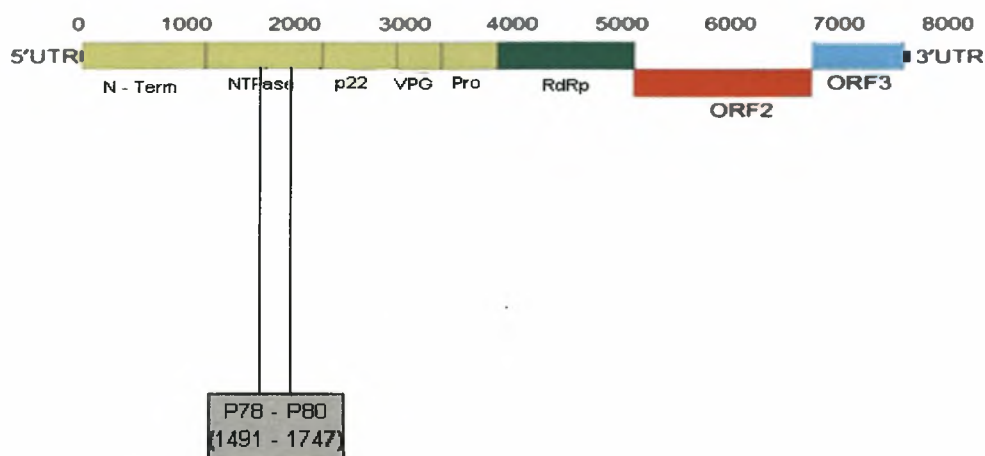
Το περιβαλλοντικό δείγμα LR6F (σχήμα 1 και 2), απομονώθηκε από τον βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας. Ταξινομείται στην ομάδα όπου ανήκουν τα πρότυπα στελέχη της GII γενετικής ομάδας, όπως είναι οι ιοί Lordsdale, Hawaii και Snow Mountain.



Σχήμα 2. Φυλογένεση του LR6F στελέχους, κατασκευασμένη από τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις γενωμικές περιοχές ORF1 και ORF2 (5796 – 6482bp).

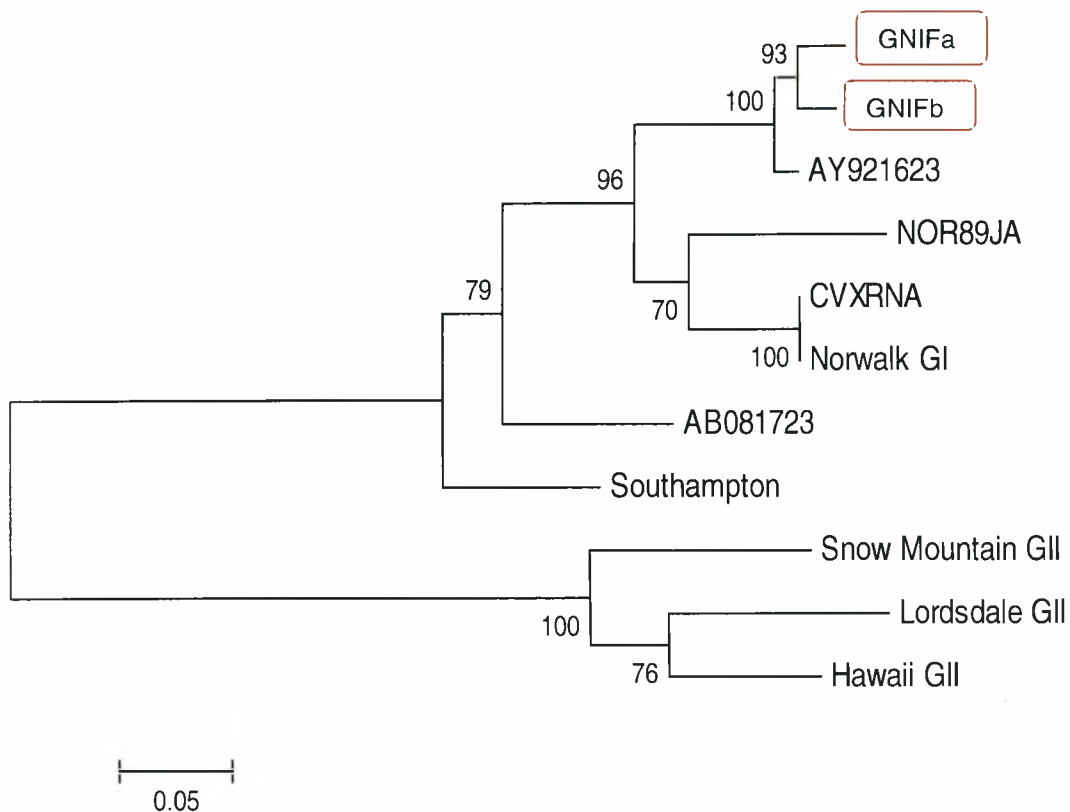
Το στέλεχος αυτό, εμφανίζει μονοφυλετική σχέση με τα άλλα στελέχη καθώς δεν σχηματίζει υποομάδα με κάποιο από αυτά, τα κοντινότερα φυλογενετικά στελέχη με αυτό, είναι εκείνα με αριθμούς καταχώρησης στη GenBank: AB039778, AB067539, AB039779 και AB067540 που έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί στο Τόκυο της Ιαπωνίας.

GNIFa και GNIFb



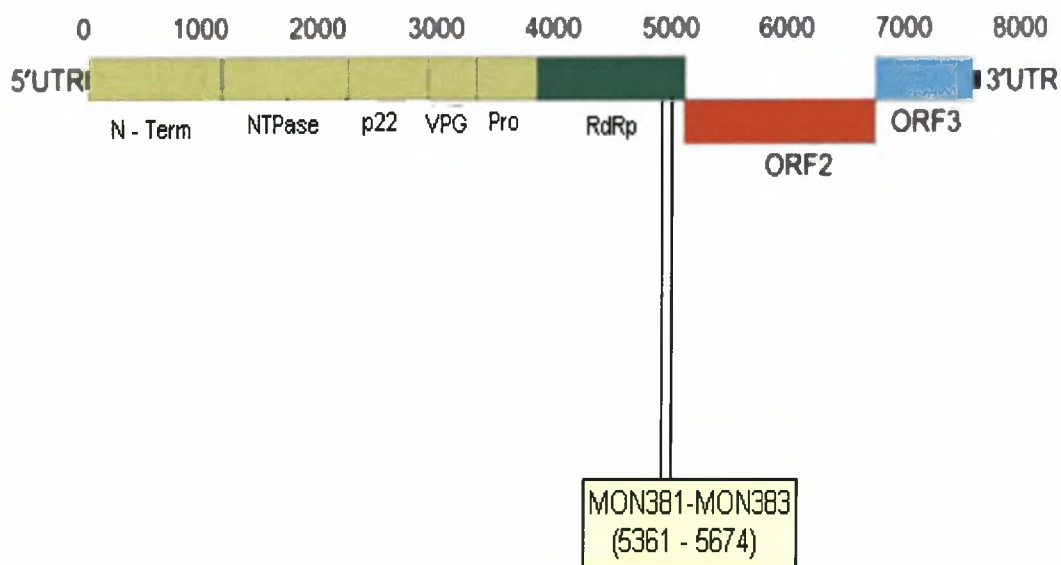
Σχήμα 3. Απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης των εκκινητών P78 – P80 που εντοπίσαν τα περιβαλλοντικά δείγματα GNIFa και GNIFb, στο γένωμα του ιού.

Τα στελέχη GNIFa και GNIFb (σχήμα 3 και 4), τα οποία απομονώθηκαν από τον βιολογικό καθαρισμό των Ιωαννίνων, προέρχονται από το ίδιο δείγμα. Από την απεικόνιση τους στο φυλογενετικό δέντρο φαίνεται πως πρόκειται για δύο διαφορετικά νοροϊικά στελέχη, γεγονός που θα μπορούσε να ερμηνευτεί σαν ταυτόχρονη μόλυνση του περιβαλλοντικού δείγματος με πάνω του ενός στελέχους. Τα στελέχη αυτά, κατατάσσονται στην γενετική ομάδα GI και ανήκουν σε χωριστό φυλογενετικό κλάδο από τα υπόλοιπα στελέχη. Η κοντινότερη τους, φυλογενετικά, αλληλουχία είναι εκείνη με αριθμό καταχώρησης στη GenBank AY921623, η οποία έχει απομονωθεί στην Γαλλία.



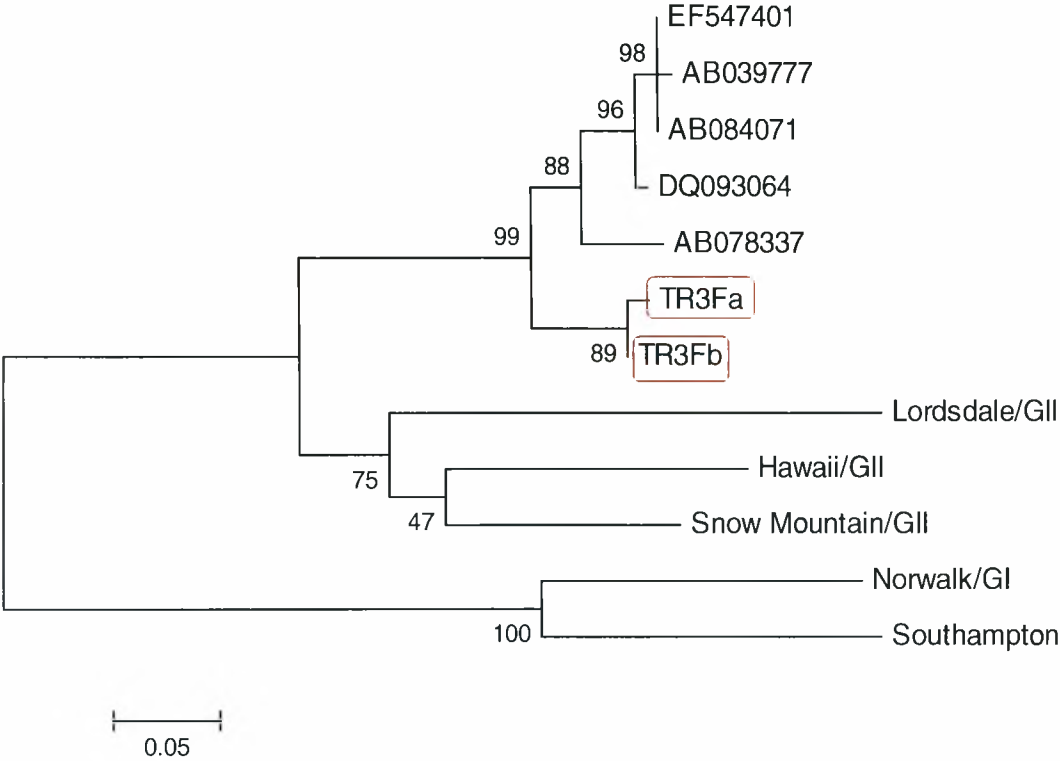
Σχήμα 4. Φυλογένεση των GNIFa και GNIFb στελεχών, κατασκευασμένη από τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε μία γενωμική περιοχή του ORF1 (1491 – 1747bp).

TR3Fa και TR3Fb

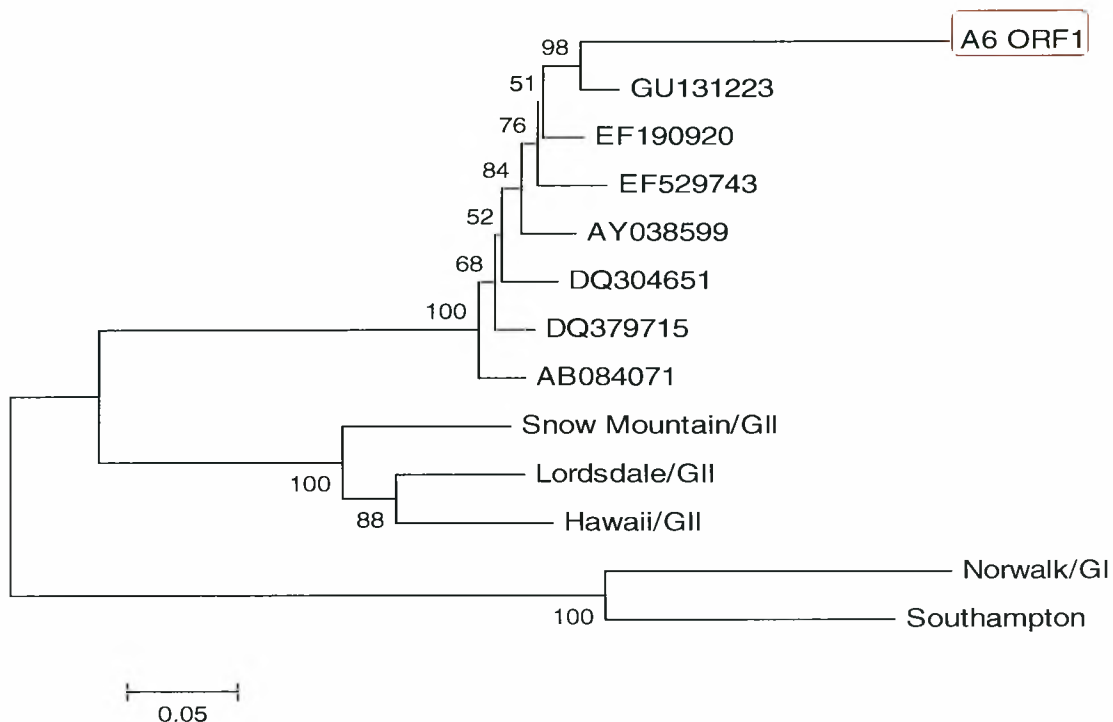


Σχήμα 5. Απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης των εκκινητών MON381 – MON383 που εντοπίσαν τα περιβαλλοντικά δείγματα TR3Fa και TR3Fb, στο γένωμα του ιού.

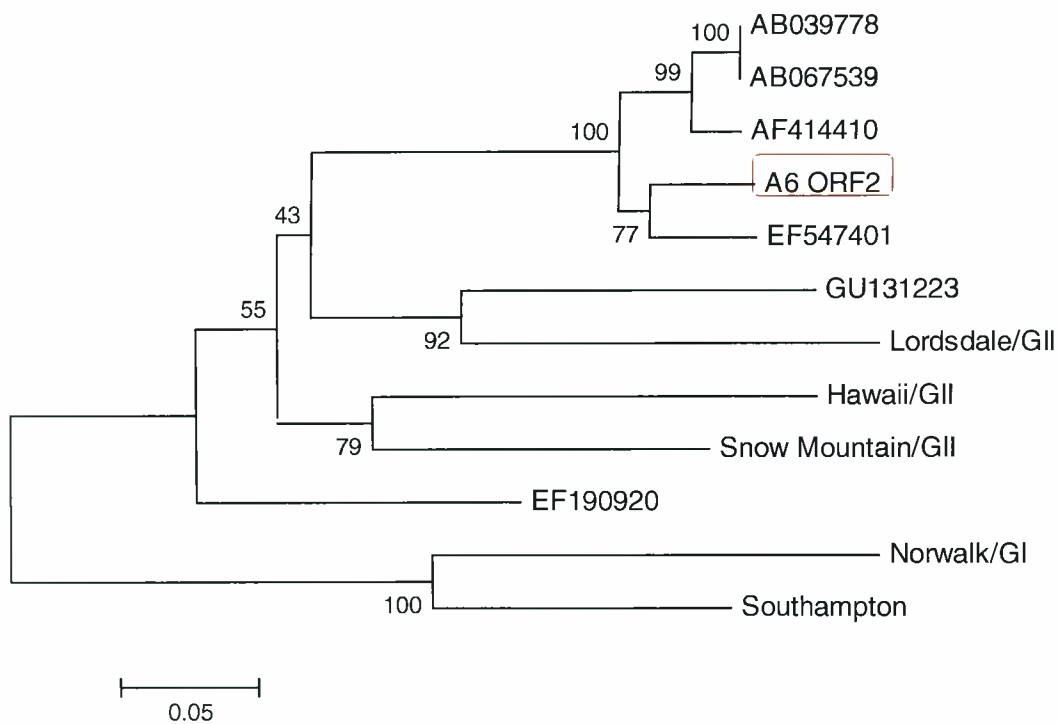
Τα στελέχη TR3Fa και TR3Fb (σχήμα 5 και 6), απομονώθηκαν από τον βιολογικό καθαρισμό των Τρικάλων. Ακολουθούν μονοφυλετική κατανομή στην GII γενετική ομάδα με κοντινότερα ταξινομικά στελέχη τα AB078337, DQ093064, AB084071, AB039777 και EF547401, τα οποία έχουν απομονωθεί στην Ιαπωνία. Ωστόσο, ο διαχωρισμός των προτύπων στελεχών της GII ομάδας σε χωριστό γενετικό κλάδο, αποδεικνύει την υψηλή απόκλιση της αλληλουχίας του στελέχους από εκείνη των συγκεκριμένων προτύπων.



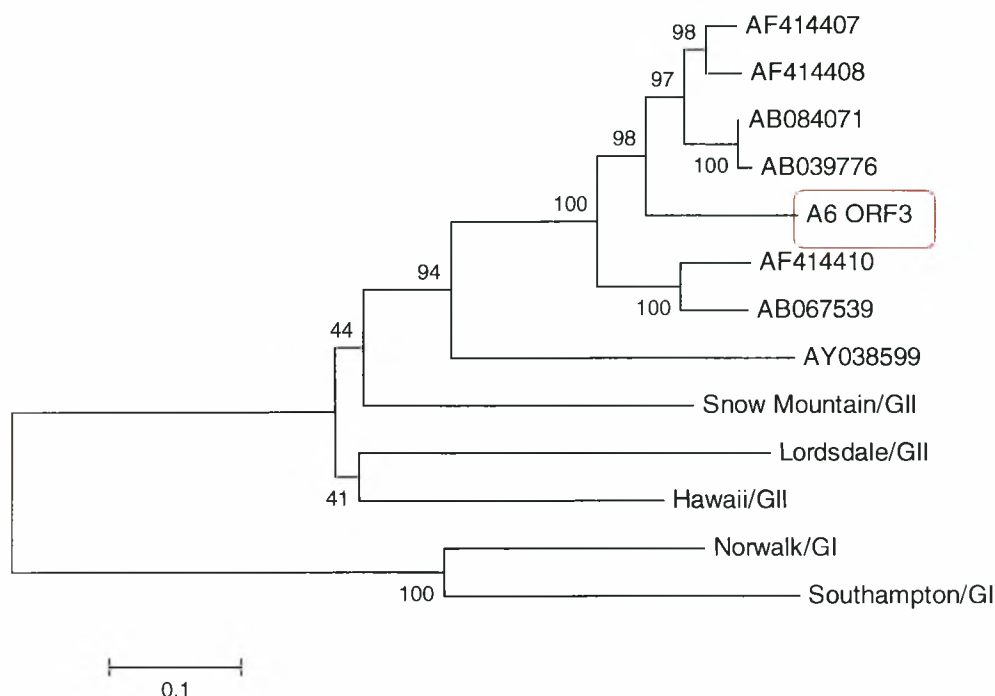
Σχήμα 6. Φυλογένεση των TR3Fa και TR3Fb στελεχών, κατασκευασμένη από τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε μία γενωμική περιοχή του ORF2 (5361 – 5674bp).



Σχήμα 8. Φυλογένεση του Α6 δείγματος στο γονίδιο ORF1



Σχήμα 9. Φυλογένεση του Α6 δείγματος στο γονίδιο ORF2



Σχήμα 10. Φυλογένεση του Α6 δείγματος στο γονίδιο ORF3

Το κλινικό δείγμα Α6 αποτελεί το μοναδικό στέλεχος το οποίο αλληλουχήθηκε σε όλη την περιοχή του ORF2 καθώς και σε μέρος των ORF1 και ORF3 γονιδίων. Στο φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει το ORF1 γονίδιο του στελέχους Α6 (σχ. 8), η αλληλουχία του βρίσκεται στον ίδιο φυλογενετικό κλάδο με το στέλεχος GU131223, το οποίο έχει απομονωθεί στην Γαλλία, ενώ στο φυλογενετικό δέντρο του ORF2 γονιδίου (σχ. 9) το στέλεχος Α6 στο ORF2 γονίδιο δημιουργεί υποομάδα με το στέλεχος EF547401, το οποίο έχει απομονωθεί στο Τόκυο της Ιαπωνίας. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην ύπαρξη πιθανού ανασυνδιασμού μεταξύ των ORF1 και ORF2 γονιδίων του κλινικού δείγματος Α6.

Τέλος, η αλληλουχία που εμπίπτει στην περιοχή του ORF3 γονιδίου, παρουσιάζει μονοφυλετική σχέση με τα άλλα στελέχη (σχ. 10). Το γεγονός αυτό, μπορεί κυρίως να οφείλεται στην έλλειψη δεδομένων για την συγκεκριμένη περιοχή, κατά συνέπεια τη μη δυνατότητα σύγκρισης. Ωστόσο παρατηρούμε ότι το στέλεχος αυτό (Α6) ομαδοποιείται με τα πρότυπα στελέχη της γενετικής ομάδας δύο. Επιπλέον το στέλεχος Α6 βρίσκεται φυλογενετικά πιο κοντά με στελέχη που έχουν απομονωθεί

στις Ηνωμένες Πολιτείες (AF414407, AF4144408) και στην Ιαπωνία (AB084071, AB039776).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νοροϊοί αποτελούν σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα, γνωστά για την πρόκληση επιδημικών εκδηλώσεων σοβαρής γαστρεντερίτιδας σε επίπεδο πληθυσμών. Τα κέντρα ελέγχου και πρόληψης, που είναι υπεύθυνα για περιπτώσεις που εμφανίζουν την αναμενόμενη κλινική εικόνα, υποβάλλουν εκθέσεις ετησίως, όπου οι ιοί αυτοί, είναι υπεύθυνοι για πάνω από το 96% όλων των περιπτώσεων μη βακτηριακής οξείας επιδημικής γαστρεντερίτιδας.

Οι νοροϊοί, διαφέρουν από τους υπόλοιπους εντερικούς ιούς κυρίως στο ότι επάγουν μια σχετικά βραχυπρόθεσμη ανοσία και έτσι τα άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό παραμένουν ευαίσθητα σε ενδεχόμενη μόλυνση καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους.

Η ασθένεια που προκύπτει μετά από μόλυνση με τον ιό, συνήθως δεν διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα σε υγιείς ενήλικες (12 – 24 ώρες), αλλά μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, όπως τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Η υψηλή μολυσματική ικανότητα του ιού, μικρότερη από 10 ιοσωμάτια ανά άτομο, μπορεί να οδηγήσει σε επιδημία τμήματα του πληθυσμού τα οποία δραστηριοποιούνται σε συγκεκριμένους χώρους «κλειστού περιβάλλοντος», όπου η μετάδοση του ιού είτε από άτομο σε άτομο είτε από μια μολυσμένη πηγή, όπως μολυσμένη τροφή ή πόσιμο νερό, διευκολύνεται. Τέτοιοι χώροι, μπορεί να περιλαμβάνουν τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας όλων των κοινωνικών ομάδων και σε όλες τις ηλικίες, όπως νοσοκομεία, εστιατόρια, ξενοδοχεία, σχολεία και στρατιωτικές μονάδες.

Δεδομένου, ότι οι νοροϊοί απεκκρίνονται στα κόπρανα των μολυσμένων ατόμων και μέσω των συστημάτων αποχέτευσης μπορούν να φτάσουν σε διάφορες πηγές νερών καθώς και το ότι είναι ανθεκτικοί στις επεξεργασίες καθαρισμού λυμάτων ή πόσιμου νερού, με αποτέλεσμα να επιβιώνουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, τους καθιστά επικίνδυνους για την δημόσια υγεία. Η ανίχνευσή τους, επομένως σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική σε επίπεδο δημόσιας υγείας.

Οι νοροϊοί, έχουν μελετηθεί εντατικά κυρίως λόγω της οξείας φύσης της ασθένειας που προκαλούν και της ταχύτατης μετάδοσης τους. Μέχρι πρόσφατα, η ανίχνευσή τους βασίζονταν στην ηλεκτρονική μικροσκοπία καθώς οι προσπάθειες αναπαραγωγής του παράγοντα αυτού σε κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματόζωα δεν είχε επιτυχία.

Σήμερα, οι αποτελεσματικότερες διαθέσιμες μέθοδοι ανίχνευσης και μελέτης των νοροϊών είναι οι μοριακές, σε επίπεδο RNA γενώματος. Διάφορα πρωτόκολλα της RT – PCR με τυπο – ειδικά ή εκφυλισμένα εκκινητικά μόρια χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την βελτιστοποίηση της διαδικασίας της ιικής ανίχνευσης σε διάφορα βιολογικά ή περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης, η εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γενωμικών περιοχών των διαφόρων κυκλοφορούντων στον πληθυσμό στελεχών είναι ένας από τους στόχους για την έρευνα των ιών αυτών, καθώς επιτρέπει την αύξηση της ειδικότητας και της απόδοσης των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, η γενετική ετερογένεια των νοροϊών δεν επιτρέπει τον σχεδιασμό μιας RT – PCR τεχνικής ικανής να ανιχνεύει όλα τα ιικά στελέχη.

Η ανίχνευση των νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα μέσω της τεχνικής RT – PCR έρχεται αντιμέτωπη με το πρόβλημα της παραγωγής πολλών μη-ειδικών PCR προϊόντων εμποδίζοντας έτσι την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Το πρόβλημα αυτό επιλύεται με την τεχνική της αλληλούχισης, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση των ειδικών PCR προϊόντων αφού προηγουμένως πραγματοποιηθεί καθαρισμός αυτών (ελεύθερα από μη-ειδικά προϊόντα) και η μοριακή κλωνοποίησή τους για την αποφυγή μιγμάτων ιικών στελεχών. Επίσης, λόγω της μικρής συγκέντρωσης ιοσωματιδίων στα περιβαλλοντικά δείγματα συνήθως απαιτείται η εφαρμογή των *autonested*, *nested* ή *seminested* PCR για την ανίχνευση των νοροϊών, γεγονός το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο επιμολύνσεων των δειγμάτων. Τέλος, ένα σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με την ανίχνευση των νοροϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι η παρουσία αναστολέων της RT-PCR τεχνικής. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την αποφυγή αυτού του προβλήματος όπως για παράδειγμα η χρησιμοποίηση εσωτερικών πρότυπων RNA μαρτύρων.

Στην παρούσα διατριβή, η αρχική ανίχνευση νοροϊών, πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της RT-PCR τεχνικής με ήδη υπάρχοντα από την βιβλιογραφία εκκινητικά μόρια. Εφαρμόστηκαν επίσης *autonested*, *nested* ή *seminested* PCR ενώ η παρουσία των αναστολέων της RT-PCR τόσο στο κλινικό όσο και στα περιβαλλοντικά

δείγματα προσδιορίστηκε με την εφαρμογή μιας PCR με το ζεύγος εκκινητικών μορίων P11P – P13P το οποίο στοχεύει στο βακτηριακό 16S rRNA. Η ανίχνευση του θετικού για νοροϊούς κλινικού δείγματος (A6) επέτρεψε την αλληλούχιση περιοχών του γονιδιώματος και την μετέπειτα χρήση των αποτελεσμάτων της, για τον σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων, προκειμένου να επιτευχθεί η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τελικά, επιτεύχθηκε η αλληλούχιση μιας περιοχής η οποία περιλαμβάνει το 3' άκρο του ORF1 (νουκλεοτίδια 4387-5098), ολόκληρο το ORF2 (νουκλεοτίδια 5099-6723) και το 5' άκρο του ORF3 (νουκλεοτίδια 6722-7456). Επιπλέον, από τα 11 περιβαλλοντικά δείγματα που αναλύθηκαν, προέκυψαν τρία θετικά για την παρουσία νοροϊών με προέλευση τους βιολογικούς καθαρισμούς των Τρικάλων, της Λάρισας και των Ιωαννίνων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκέντρωση των περιβαλλοντικών δειγμάτων ήταν δυο: η μέθοδος διαχωρισμού δυο φάσεων και η μέθοδος των φίλτρων. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση και των τριών θετικών περιβαλλοντικών δειγμάτων είχε πραγματοποιηθεί με τη τεχνική των φίλτρων. Επιπλέον, παρά την εφαρμογή όλων των εκκινητικών μορίων (νέων και ήδη υπαρχόντων από την βιβλιογραφία) επιτεύχθηκε τελικά η αλληλούχιση μιας μόνο μικρής γενωμικής περιοχής (280-700 bp) σε κάθε ένα από τα τρία περιβαλλοντικά δείγματα.

Ακολούθησε η φυλογενετική ανάλυση του κλινικού στελέχους A6, όπου κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, ένα για κάθε αναγνωστικό πλαίσιο του γενώματος (ORF1, ORF2, ORF3). Και στα τρία φυλογενετικά δέντρα, το στέλεχος A6, ομαδοποιείται με στελέχη από την GeneBank τα οποία ανήκουν στην γενετική ομάδα GII, μεταξύ των οποίων και τα πρότυπα στελέχη Lordsdale, Snow Mountain και Hawaii. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, το στέλεχος A6 σχηματίζει υποομάδα με διαφορετικά στελέχη στα φυλογενετικά των ORF1 και ORF2. Συγκεκριμένα, στο δέντρο του ORF1 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος (GU131223) που απομονώθηκε από περιοχή της δυτικής Σουηδίας ενώ στο δέντρο του ORF2 σχηματίζει υποομάδα με ένα στέλεχος (EF547401) που απομονώθηκε από περιοχή της Ιαπωνίας. Το γεγονός αυτό, αποτελεί ένδειξη ανασυνδυασμού στην περιοχή ένωσης μεταξύ των ORF1 και ORF2. Στο δέντρο του ORF3 το κλινικό στέλεχος A6 εμφανίζει μονοφυλετική σχέση με τα άλλα στελέχη, γεγονός το οποίο οφείλεται πιθανόν στον περιορισμένο αριθμό των κατατεθειμένων στην GeneBank αλληλουχιών του ORF3. Ωστόσο, τα κοντινότερα φυλογενετικά στελέχη με αυτό είναι εκείνα με αριθμούς καταχώρησης στην GenBank AB084071, AB039776,

AF414407 και AF414408 τα οποία απομονώθηκαν από περιοχή της Ιαπωνίας τα δυο πρώτα και από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής τα δυο τελευταία.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα τρία περιβαλλοντικά δείγματα LR6F, GN1F και TR3F αλληλουχίστηκαν σε μία μόνο μικρή περιοχή του γονιδιώματος. Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών στην GenBank έδειξε ότι τα στελέχη GN1F εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα GI γεγονός το οποίο συμφωνεί με την ενίσχυση των αντίστοιχων PCR προϊόντων με τα ειδικά για την γενετική ομάδα GI εκκινητικά μόρια P78 – P80 που στοχεύουν στην περιοχή της NTPάσης του ORF1. Αντίθετα τα στελέχη LR6F και TR3F εμφανίζουν ομολογία με στελέχη που ανήκουν στην γενετική ομάδα GII γεγονός που επίσης συμφωνεί με την ενίσχυση των αντίστοιχων PCR προϊόντων με τα ειδικά για την γενετική ομάδα GII εκκινητικά μόρια, mon381 – mon383 και NLVORF1290 – NLVORF1974, αντίστοιχα, που στοχεύουν στα ORF1 και ORF2.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αποτελεί μια προσπάθεια για την αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος κάποιου ή κάποιων στελεχών των νοροϊών που κυκλοφορούν στον ελληνικό πληθυσμό και κρίνεται αναγκαία η αλληλούχιση όσο το δυνατόν περισσότερων γενωμικών περιοχών, προκειμένου να καταστούν εφικτές φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, Tauxe RV. Food - related illness and death in the United States. Reply to Dr. Hedberg. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 841–842.
2. Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35: 275–290, viii.
3. Rockx B, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35:246–253.
4. Lopman B, Zambon M, Brown DW. The evolution of norovirus, the “gastric flu”. *PLoS Med* 2008; 5: e42.
5. Hodges R.G., McCorkle L.P., Badger G.F., Curtiss C., Dingle J.H., Jordan W.S. A study of illness in a group of cleveland families: XI.The occurrence of gastrointestinal symptoms. *Am J Hyg* 1956; 64: 349-56.
6. Gordon I., Ingraham H.S., Korns R.F. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* 1947;86:409-422.
7. Kojima S., Fukumi H., Kusama H., et al. Studies on the causative agent of the infectious diarrhea: records of the experiments on human volunteers. *Jpn Med J* 1948; 1: 467-476.
8. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075–1081.
9. Adler J.L. and R. Zickl. Winter vomiting disease. *J. Infect Dis.* 1969; 119: 668-673.
10. Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1972; 140: 578-583.
11. Almeida J.D., Waterson A.P. The morphology of virus-antibody interaction. *Adv Virus Res* 1969; 15: 307-338.
12. Thornhill T.S., Wyatt R.G., Kalica A.R., et al. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm virus-like particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; 135: 20-27.
13. Dolin R., Reichman R.C., Roessner K.D., et al. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982; 146: 184-189.

14. Caul E.O. and Appleton H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. *J Med Virol* 1982;9:257-65.
15. Jiang X., Wang M., Wang K., et al. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* 1993; 195: 51-61.
16. Lambden P.R., Caul O., Ashley C., et al. Sequence and genome organization of a human small round structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993;259:516-519.
17. Liu B.L., Lambden P.R., Gunther H., et al. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73 :819-825.
18. Karst S.M., Wobus C.E., Lay M., et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003; 299:1575-1578.
19. Parashar UD, Monroe SS (2001). "Norwalk-like viruses" as a cause of foodborne disease outbreaks". *Rev. Med. Virol.* 11 (4): 243-52. doi:10.1002/rmv.321. PMID 11479930
20. Jiang, X. et al. (1990) Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 250, 1580–1583
21. Prasad, B.V. et al. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287–290
22. Glass, P.J. et al. (2000) The Norwalk virus ORF 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* 74, 6581–6591
23. Bertolotti - Ciarlet, A. et al. (2002) Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* 76, 4044–4055
24. Green, K.Y. et al. (2001) Human calciviruses. In *Fields Virology* (Vol. 1) (Knipe, D.M. et al., eds), pp. 841–874, Lippincott, Williams & Wilkins
25. Vinje, J. et al. (2000) Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of “Norwalk-like viruses”. *Arch. Virol.* 145, 223–241
26. Oliver, S.L. et al. (2003) Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J. Virol.* 77, 2789–2798
27. Deng, Y. et al. (2003) Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2300–2305
28. Smiley, J.R. et al. (2003) Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3089–3099

29. Sugieda, M. and Nakajima, S. (2002) Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus "Norwalk-like viruses". *Virus Res.* 87, 165–172
30. Karst, S.M. et al. (2003) STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299, 1575–1578
31. Fankhauser, R.L. et al. (2002) Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like Viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* 186, 1–7
32. Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-323.
33. Hale, A. et al. (2000) Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J. Med. Virol.* 62, 99–103
34. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 1994;343:1240–1242.
35. Duizer, E., K. J. Schwab, F. H. Neill, R. L. Atmar, M. P. Koopmans, and M. K. Estes. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* 85:79-87.
36. Green, K. Y., R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. 2001. Human Caliciviruses, p. 841-874. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
37. Wobus C.E., Karst S.M., Thackray L.B., et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology* 2004; 2:e432.
38. Jiang X, Graham D, Wang K, Estes M. NV genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250:1580–1583.
39. Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. NV genome cloning and characterization. *Science* 1990;250:1580–1583.
40. Baric RS, et al. Expression and self-assembly of NV capsid protein from Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol* 2002;76:3023–3030.
41. Green KY, Lew JF, Jiang X, Kapikian AZ, Estes MK. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant NV capsid antigen with those of the native NV antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *J Clin Microbiol* 1993;31:2185–2191. Baric RS, et al. Expression and self-assembly of NV capsid protein from Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Virol* 2002;76:3023–3030.

42. Jiang X, Wang M, Graham D, Estes M. Expression, self-assembly and antigenicity of the NV capsid protein. *J Virol* 1992;66:6527–6532.
43. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the NV capsid. *Science* 1999;286:287–290.
44. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed NV capsids. *J Virol* 1994;68: 5117–5125.
45. Venkataram Prasad BV, Hardy ME, Estes MK. Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *J Infect Dis* 2000;181 (Suppl.):S317–S321.
46. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histoblood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol* 2003;77:12562–12571.
47. Cao S, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007;81:5947–5957.
48. Pettersen EF, et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605–1612.
49. (22) Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *J Virol* 2003;77:7150–7155.
50. Ettayebi K, Hardy ME. NV nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* 2003;77:11790–11797.
51. Fernandez-Vega V, et al. NV N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* 2004;78:4827–4837.
52. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the NV binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J* 2003;22:2852–2859.
53. Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol J* 2006;3:33.
54. Rohayem J, Robel I, Jager K, Scheffler U, Rudolph W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol* 2006;80:7060–7069.
55. Rohayem J, Jager K, Robel I, Scheffler U, Temme A, Rudolph W. Characterization of norovirus 3Dpol RNA-dependent RNA polymerase activity and initiation of RNA synthesis. *J Gen Virol* 2006;87:2621–2630

56. Blakeney SJ, Cahill A, Reilly PA. Processing of NV nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* 2003;308:216–224.
57. Liu B, Clarke IN, Lambden PR. Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis. *J Virol* 1996;70:2605–2610.
58. Liu BL, Lambden PR, Gunther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol* 1999;73:819–825.
59. Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* 1999;73:10531–10535.
60. Sosnovtsev SV, et al. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 2006;80:7816–7831
61. Nakamura K, et al. A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol* 2005;79:13685–13693.
62. Someya Y, Takeda N, Miyamura T. Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J Virol* 2002;76:5949–5958.
63. Ward JM, et al. Pathology of immunodeficient mice with naturally occurring murine norovirus infection. *Toxicol Pathol* 2006;34:708–715.
64. Zeitler CE, Estes MK, Venkataram Prasad BV. X-ray crystallographic structure of the NV protease at 1.5-Å resolution. *J Virol* 2006;80:5050–5058.
65. Fukushi S, et al. Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* 2004;78:3889–3896.
66. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm NV: an historic perspective. *J Infect Dis* 2000;181 (Suppl):S295–S302.
67. Kapikian ZZ, Estes MK, Chanock RM. Norwalk Group of Viruses. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996
68. Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of NV RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:10327–10332.
69. Neill J.D. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* 2002;87:89-93.
70. Wagner, E.K.; Martinez, H. Basic Virology. Malden, MA. Blackwell Science, 1999, (www.netlibrary.com).

71. Marionneau S., Ruvoen N., Le Moullac-Vaidye B., et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122:1967-1977.
72. Harrington PR, Yount B, Johnston RE, Davis N, Moe C, Baric RS. Systemic, mucosal, and heterotypic immune induction in mice inoculated with Venezuelan equine encephalitis replicons expressing NV-like particles. *J Virol* 2002;76:730-742.
73. Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of NV-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol* 2002;76:12335-12343.
74. Harrington PR, Vinje J, Moe CL, Baric RS. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol* 2004;78:3035-3045.
75. Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. Department of molecular V, microbiology BCoMHTUSA. NV-like particle hemagglutination by binding to h histo-blood group antigens. *J Virol* 2003;77:405-415.
76. Marionneau S, et al. NV binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002;122:1967-1977.
77. Lindesmith L, et al. Human susceptibility and resistance to NV infection. *Nat Med* 2003;9:548-553.
78. Marionneau S, et al. ABH and Lewis histoblood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 2001;83:565-573.
79. Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, Svensson L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin Immunol* 2006;18:375-386)
80. Hennessy EP, Green AD, Connor MP, Darby R, MacDonald P. NV infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2003;188:176-177
81. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. NV infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002;185:1335-1337.
82. Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, Duizer E, Koopmans MP. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* 2005;191: 749-754.
83. Koopman JS, Eckert EA, Greenberg HB, Strohm BC, Isaacson RE, Monto AS. NV enteric illness acquired by swimming exposure. *Am J Epidemiol* 1982;115:173-177.

84. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, Kapikian AZ, Blacklow NR. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N Engl J Med* 1977;297:86–89.
85. Johnson PC, Mathewson JJ, DuPont HL, Greenberg HB. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *J Infect Dis* 1990;161:18–21.
86. Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *J Virol* 2005;79:2900–2909.
87. Larsson MM, et al. Antibody prevalence and titer to Norovirus (Genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but Not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J Infect Dis* 2006;194:1422–1427.
88. Lindesmith LC, et al. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 2008;5:e31
89. Koelle K, Cobey S, Grenfell B, Pascual M. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science* 2006;314:1898–1903.
90. Van Nimwegen E. Epidemiology. Influenza escapes immunity along neutral networks. *Science* 2006;314:1884–1886.
91. Siebenga JJ, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007;81:9932–9941
92. Nilsson M, et al. Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype. *J Virol* 2003;77:13117–13124.
93. Kaplan JE, Schonberger LB, Varano G, Jackman N, Bied J, Gary GW. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home. Demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982;116:940–948.
94. Ike AC, Brockmann SO, Hartelt K, Marschang RE, Contzen M, Oehme RM. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* 2006;44:1262–1267.
95. Jiang X, et al. Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses. *J Med Virol* 1996;50:335–341.

96. Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants over 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:46–49.
97. Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635–1641.
98. Mattner F, Sohr D, Heim A, Gastmeier P, Vennema H, Koopmans M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:69–74.
99. Parashar UD, Monroe SS “Norwalk -like viruses” as a cause of foodborne disease outbreaks. *Rev Med Virol* 2001;11:243–252.
100. Fankhauser RL, et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 2002;186: 1–7.
101. Waters A, Coughlan S, Dunford L, Hall WW. Molecular epidemiology of norovirus strains circulating in Ireland from 2003 to 2004. *Epidemiol Infect* 2006;134: 917–925.
102. Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, Monroe SS, Glass RI. Identification of a distinct common strain of “Norwalk-like viruses” having a global distribution. *J Infect Dis* 1999;179: 1334–1344.
103. Vinje J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1997;176:1374–1378.
104. Widdowson MA, et al. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus – United States, 2002. *J Infect Dis* 2004;190:27–36.
105. Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Sarangi J, Brown DW. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. *Clin Infect Dis* 2004;39: 318–324.
106. Phan TG, et al. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004–2005. *Clin Lab* 2006;52:519–525.
107. Norovirus activity–United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52: 41–45.

108. Vainio K, Myrmel M. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays. *J Clin Microbiol* 2006;44: 3695–3702.
109. Bull RA, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2006;44:327–333.
110. Kroneman A, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill* 2006;11:E0612141.
111. Norovirus activity–United States, 2006–2007. *Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:842–846
112. Siebenga JJ, et al. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* 2007;81:9932–9941.
113. CDC. *Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56:842–846
114. Crane J.K., Guerrant R.L. *Acute Watery Diarrhea*. New York: Raven Press; 1995.
115. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9: 247-262.
116. Barker J., Vipond I.B., Bloomfield S.F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect* 2004;58:42-122. Outbreaks of Norwalk-like viral gastroenteritis - Alaska and Wisconsin, 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2000;49:207-211.
117. Estes M.K., Ball J.M., Guerrero R.A.. Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J Infect Dis* 2000;181:S367-373.
118. Treanor JJ, Dolin R. Norwalk Virus and Other Caliciviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, 5th Edition ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol. 2. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. 1949-1956.
119. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14:15-37.
120. CDC Norovirus Activity- United States 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003;52:41-45.
121. Parashar UD, Quiroz ES, Mounts AW, et al. “Norwalk-like viruses:” Public health consequences and outbreak management. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001;50: 1-17.